

PAULO JOSÉ LORENZONI

**MELAS: ESTUDO CLÍNICO, BIOQUÍMICO,
ELETROFISIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Herminia Scola

CURITIBA

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS / BIBLIOTECA CENTRAL
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS TÉCNICOS

Lorenzoni, Paulo José

MELAS : estudo clínico, bioquímico, eletrofisiológico, morfológico e molecular / Paulo José Lorenzoni. – Curitiba, 2008.
111f. : il. algumas color., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosana Hermínia Scola

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Mitocôndria - Doenças. I. Scola, Rosana Hermínia. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. III. Título.

CDD 572.869



PARECER

Aos dezessete dias do mês de julho do ano de dois mil e oito, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores **Cláudia Ferreira Sobreira**, **Rosana Herminia Scola** e Dr. **Lineu César Werneck**, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Paulo José Lorenzoni**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde – Mestrado, da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “**MELAS: ESTUDO CLINICO, BIOQUIMICO, ELETROFISIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR**”. A Banca examinadora considerou que **Paulo José Lorenzoni**, apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 17 de julho de 2008.


Prof. Dra. Cláudia Ferreira Sobreira


Prof. Dra. Rosana Herminia Scola


Prof. Dr. Lineu César Werneck

DEDICATÓRIA

A trajetória de vida, guerreira e aguerrida da família – **Neuso, Ana Ladi e Ana Paula** – coroaram de êxito minha existência. A eles, profunda compreensão, na certeza de que os exemplos deixados serão exemplos seguidos.

AGRADECIMENTOS

À **Professora Dra Rosana Herminia Scola**, minha orientadora, pela perspicácia e sensibilidade com que me acolheu na equipe do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas. Sua disponibilidade e competência em dirigir nossos trabalhos são sempre admiráveis.

Ao **Professor Dr Lineu César Werneck**, pioneiro nas doenças neuromusculares, a minha reverência. Continuar na equipe após o término da residência médica, foi um privilégio.

À **Dra Cláudia Suemi Kamoï Kay**, médica e amiga, o meu reconhecimento pelo apoio prestado em múltiplas e preciosas oportunidades. Obrigado!

Aos Professores e Médicos do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas, **Dr Edison Nývák, Dr Carlos Silvado, Dr Hélio Teive, Dr Walter Arruda, Dra Viviane Zétola, Dr Luciano de Paola, Dr Pedro Kowacs, Dr Mauro Piovesan, Dr Elcio Piovesan, Dr Hipólito Carraro, Dra Ana Crippa, Dr Francisco Germiniani e Dr Marcos Lange**, gratidão e respeito pelo acompanhamento na minha formação profissional.

Os estudos genéticos, vistos pela ótica das bioquímicas **Aline Andrade Freund e Raquel Cristina Arndt**, ganharam enfoques diferenciados. Obrigado!

Às técnicas do laboratório de histoquímica, **Eunice e Nyvia**, pelo auxílio técnico recebido. Foram de grande valia!

Aos Professores do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde** da Universidade Federal do Paraná, pelos ensinamentos no decorrer do curso.

Às secretárias **Lúcia e Valéria**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, sempre dispostas a ajudar.

À **Fundação Araucária** pelo suporte financeiro.

À todos, que direta ou indiretamente me motivaram neste processo, a certeza da minha admiração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 MITOCÔNDRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	03
2.2 DNA MITOCONDRIAL HUMANO	05
2.3 GENÉTICA MITOCONDRIAL	10
2.4 DOENÇAS MITOCONDRIAIS	14
2.5 DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS	19
2.6 MELAS	
2.6.1 Histórico	23
2.6.2 Critérios diagnósticos	24
2.6.3 Correlação entre alterações clínicas e fisiopatologia	25
2.6.4 Genética mitocondrial	34
2.6.5 Alterações laboratoriais e bioquímicas	38
2.6.6 Alterações morfológicas	39
3 OBJETIVOS	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	45
4.2 EXAME LABORATORIAL	45
4.3 ELETROCARDIOGRAMA	46
4.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA	46
4.5 ESTUDO NEURORADIOLÓGICO	46
4.6 ESTUDO BIOQUÍMICO	47
4.7 BIÓPSIA MUSCULAR	47
4.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL	49
4.8.1 Extração do DNAm_t de amostras de músculo	50
4.8.2 Identificação das mutações no DNAm_t	51

5 RESULTADOS	
5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	56
5.2 EXAME LABORATORIAL	58
5.3 ELETROCARDIOGRAMA	59
5.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA	60
5.5 ESTUDO NEURORADIOLÓGICO	61
5.6 ESTUDO BIOQUÍMICO	64
5.7 BIÓPSIA MUSCULAR	65
5.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL	71
5.8.1 Identificação das mutações no DNAm	71
6 DISCUSSÃO	
6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA	76
6.2 EXAME LABORATORIAL	78
6.3 ELETROCARDIOGRAMA	80
6.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA	80
6.5 ESTUDO NEURORADIOLÓGICO	82
6.6 ESTUDO BIOQUÍMICO	83
6.7 BIÓPSIA MUSCULAR	83
6.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL	85
7 CONCLUSÕES	89
8 REFERÊNCIAS	91
9 APÊNDICE	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fosforilação oxidativa da cadeia respiratória	04
Figura 2 – Subunidades da cadeia respiratória codificadas pelo DNAMt e DNAn	06
Figura 3 – Mapa do DNAMt	09
Figura 4 – Transmissão materna e segregação replicativa do DNAMt	13
Figura 5 – Mecanismo fisiopatológico dos episódios semelhantes à AVC	32
Figura 6 – Aspecto neuroradiológico	63
Figura 7 – Biópsia muscular com RRF (caso 1)	68
Figura 8 – Biópsia muscular com RRF (caso 7)	68
Figura 9 – Reação histoquímica para COX	69
Figura 10 – Comportamento dos vasos na biópsia muscular	70
Figura 11 – PCR/RLFP para mutação ponto A3243G	74
Figura 12 – PCR/RLFP para mutação ponto T3271C	74
Figura 13 – Seqüenciamento do gene tRNA ^{Leu (UUR)}	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Manifestações clínicas e classificação genética das principais encefalomiopatias mitocondriais	18
Tabela 2 – Mutações associadas com fenótipo de MELAS	37
Tabela 3 – Descrição clínica	57
Tabela 4 – Alterações laboratoriais	59
Tabela 5 – Achados eletrofisiológicos	60
Tabela 6 – Achados neuroradiológicos	62
Tabela 7 – Dosagem de enzimas musculares	65
Tabela 8 – Características das fibras musculares e vasos na biópsia muscular	67
Tabela 9 – Resultado do estudo molecular	73
Tabela 10 – Características do DNA extraído de biópsia muscular	111

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
AL	aldolase
ATP	trifosfato de adenosina
AVC	acidente vascular cerebral
~AVC	semelhante à acidente vascular cerebral
bp	pares de base
CK	creatina quinase
COX	citocromo c oxidase
COX-	fibras com deficiência da citocromo c oxidase
D-loop	alça de deslocamento
DNAmt	DNA mitocondrial
DNA n	DNA nuclear
H	cadeia pesada
HE	hematoxilina e eosina
MELAS	miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios ~AVC
MERRF	epilepsia mioclônica com RRF
NADH	nicotinamida desidrogenase tetrazolium redutase
NARP	Neuropatia periférica, ataxia e retinopatia pigmentar
nt	nucleotídeo
OEPC	oftalmoplegia externa progressiva crônica
PAS	ácido periódico de Schiff
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCR/RFLP	PCR com polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
RRF	fibras rasgadas vermelhas ou “ragged-red fibers”
SDH	desidrogenase succínica
SDH+	reação histoquímica forte para SDH
TGM	tricromo de Gomori modificado
tRNA	RNA transportador
L	cadeia leve
LCR	líquido cefalorraqueano
O_H	origem da cadeia H
O_L	origem da cadeia L

RESUMO

Introdução: MELAS é uma das doenças mitocondriais caracterizada por miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico. *Objetivo:* Conhecer as características da síndrome de MELAS, apresentadas por pacientes acompanhados pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, para: (1) caracterizar suas manifestações clínicas, laboratoriais, bioquímicas e morfológicas; (2) determinar mutações do gene do RNA transportador de leucina UUR (tRNA^{Leu(UUR)}) do DNA mitocondrial (DNAm); e (3) verificar a utilidade da biópsia muscular como método diagnóstico da síndrome de MELAS quando comparada ao estudo molecular do gene tRNA^{Leu(UUR)} do DNAm. *Material e Métodos:* Os 9 pacientes com MELAS foram analisados com base nas manifestações clínicas, laboratoriais, neuroradiológicas, eletrocardiográficas e eletroneuromiográficas. A biópsia muscular foi avaliada principalmente pelas colorações do tricromio de Gomori modificado (MGT), desidrogenase succínica (SDH) e citocromo c oxidase (COX). O DNAm foi extraído de material proveniente de biópsia muscular sendo o gene tRNA^{Leu(UUR)} analisado por reação em cadeia de polimerase com polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR/RLFP) e seqüenciamento direto. *Resultados:* O início da doença foi antes dos 15 anos em 6 pacientes. Os episódios semelhantes à AVC estavam presentes em todos os pacientes e os outros sintomas relatados foram vômitos, cefaléia, crise convulsiva, fraqueza muscular, demência, surdez, baixa estatura, ptose palpebral, oftalmoparesia, ataxia e neuropatia facial. O nível de ácido láctico sérico foi aumentado em 8 pacientes. O estudo das imagens do crânio revelou padrão semelhante à AVC em todos os pacientes sendo encontrado lesão unilateral em 5 pacientes e bilateral em 4 pacientes. As fibras rasgadas vermelhas (RRF) ocorreram em 88,8% na coloração pelo MGT e em 100% pela SDH, porém foi encontrada freqüência acima de 2% de RRF em 55,5% dos pacientes na coloração pelo MGT e 88,8% pela SDH. A análise pela coloração da COX mostrou atividade deficiente em 14,2%. Vasos com forte reação para SDH (SDH+) ocorreram em 55,5% dos pacientes numa freqüência que variou de 33,3% até 75% nesses casos. O estudo molecular do gene tRNA^{Leu(UUR)} por PCR/RLFP e sequenciamento direto mostrou a mutação A3243G no DNAm em 3 pacientes. *Conclusões:* Os pacientes com MELAS tem variação na apresentação de suas manifestações clínicas, sendo que alterações típicas de MELAS, como sinais de encefalopatia, episódios semelhantes à AVC em idade jovem, episódios de cefaléia e vômitos recorrentes, nível elevado de ácido láctico podem ser encontrados na maioria dos pacientes. A falta de alterações nos estudos eletrofisiológicos e no nível sérico da CK não afastam seu diagnóstico. As lesões semelhantes à AVC nas regiões temporal, occipital e parietal são as mais sugestivas dessa doença. A deficiência de COX pode ocorrer em pacientes com MELAS. A reação histoquímica para SDH é superior à coloração pelo TGM na identificação de RRF. A falta de vasos SDH+ na biópsia muscular não exclui o diagnóstico da doença. A mutação ponto A3243G do DNAm é a mais freqüente relacionada com MELAS. O uso da biópsia muscular como método diagnóstico de MELAS ainda se revela superior ao da pesquisa de mutações do gene tRNA^{Leu(UUR)} do DNAm.

ABSTRACT

Background: MELAS is one of mitochondrial disease characterized by mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Objective:* To analyze patients suffering from of MELAS at Clinical Hospital of Federal University of Paraná: (1) clinical, laboratorial, biochemistry and histological findings; (2) mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in tRNA^{Leu(UUR)} gene; and (3) to compare muscle biopsy and molecular analysis of tRNA^{Leu(UUR)} gene as diagnostic method to MELAS syndrome. *Method:* Study of 9 patients with MELAS with correlation between clinical findings, laboratorial data, radiological and electrophysiological findings. Muscle biopsies were evaluated mainly by modified Gomori-trichrome (MGT), succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome c oxidase (COX) stains. DNAm_t was obtained from muscle biopsy specimen which was analysed of tRNA^{Leu(UUR)} gene by PCR/RLFP and direct sequencing. *Results:* The onset was before age 15 years in 6 patients. Stroke-like episodes was present in all patients and the others symptoms reported were vomiting, headache, seizures, weakness, dementia, hearing loss, short stature, ocular symptoms, ataxia and facial neuropathy. Blood lactate levels was increased in 8 patients. Brain image study reveals stroke-like pattern in all patients with lesion pattern unilateral in 5 patients and bilateral in 4 patients. Ragged-red fibers (RRF) occurred in MGT (88.8%) and SDH (100%) stains, but the frequency above 2% of RRF was found in 55.5% of patients on MGT stain and in 88.8% on SDH stain. COX stain analysis showed deficient activity in 14.2%. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels (SSV) occurred in 55.5% of patients which frequency ranged from 33.3% to 75% in these cases. The molecular analysis showed the A3243G mutation on mtDNA in 3 patients. *Conclusion:* MELAS patients have variations in their clinical manifestation, but the main dysfunctions of MELAS syndrome, as encephalopathy, stroke-like, headache, vomiting and increased lactate levels can be found in MELAS phenotype. Stroke-like lesions are more common in temporal, occipital and parietal regions. COX deficiency can occur in MELAS patients. RRF presence was increased in SDH than in MGT stain. Absent SSV in muscle biopsy specimens should not be used as exclusion criteria for MELAS. A3243G point mutation is the most related with the MELAS phenotypic in tRNA^{Leu(UUR)} gene. Muscle biopsy as diagnostic method is better than molecular analyze of tRNA^{Leu(UUR)} gene in MELAS syndrome.

1 INTRODUÇÃO

Considerando que a mitocôndria é a principal organela responsável pelo fornecimento de energia para manutenção e funcionamento das células, distúrbios no sistema de fosforilação oxidativa podem provocar alterações sistêmicas em diferentes órgãos, dando causa às denominadas doenças mitocondriais [DiDONATO, 2000]. Assim, as doenças mitocondriais formam um grupo heterogêneo de síndromes que são caracterizadas por quadro clínico multiforme, mas que apresentam em comum os defeitos bioquímicos na cadeia respiratória [BETTS et al, 2004; DiMAURO, 2004; ZEVIANI & DiDONATO, 2004].

Dentre as principais, destacamos a MELAS, denominação que recebe pela forte associação encontrada entre miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (AVC) [PAVLAKIS et al, 1984]. A suspeita de pacientes com MELAS pode ser feita com base nas suas alterações clínicas, laboratoriais, eletrofisiológicas e neuroradiológicas, sendo o diagnóstico confirmado pelo estudo bioquímico ou pela biópsia muscular [CIAFALONI et al, 1992; GOTO et al, 1990; GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992]. Após a descoberta da mutação ponto A3243G do DNAm^t afetando o gene tRNA^{Leu(UUR)} no músculo de pacientes com MELAS, o estudo molecular do DNAm^t tem sido utilizado para confirmar o diagnóstico da doença, permitir o aconselhamento genético dos familiares e aumentar a compreensão dos mecanismos moleculares que causam essa doença [CIAFALONI et al, 1992; GOTO et al, 1990; GOTO et al, 1992; HAMMANS et al, 1991; KOBAYASHI et al, 1990].

A partir da observação de alguns casos de doença mitocondrial, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, que apresentavam em comum os episódios semelhantes à AVC, surgiu a curiosidade em pesquisar as mutações do DNAMt, causa da disfunção mitocondrial, de forma semelhante a literatura internacional, mas com enfoque em alguns aspectos relacionados com a utilidade da biópsia muscular e do estudo molecular como métodos de diagnóstico.

Dessa forma, o presente estudo se propõe a investigar pacientes com MELAS caracterizando suas principais manifestações clínicas, laboratoriais e bioquímicas, bem como, analisando a utilização da biópsia muscular e do estudo molecular, especialmente do DNAMt, como métodos de diagnóstico das doenças mitocondriais.

Para tanto, apresenta-se uma revisão da literatura sobre os elementos principais do mecanismo de funcionamento da mitocôndria, da sua peculiar genética, do grupo heterogêneo que compõe as doenças mitocondriais, os aspectos fisiológicos e patológicos envolvidos com a síndrome de MELAS, bem como se submete à análise morfológica de biópsia muscular e ao estudo molecular.

Nesse sentido, torna-se imprescindível a viabilização de metodologia do estudo molecular do DNAMt, adaptadas as condições da Universidade Federal do Paraná, em busca de novos resultados que possam auxiliar no diagnóstico de pacientes, fornecer subsídios para um aconselhamento genético e para a compreensão dos mecanismos moleculares das doenças mitocondriais e para, quiçá, vir a representar um primeiro passo para futuros tratamentos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MITOCÔNDRIA E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A mitocôndria é uma organela intracelular responsável pelo fornecimento da maior parte da energia requerida pelas células, através da produção de trifosfato de adenosina (ATP), sendo composta em sua estrutura pelos seguintes compartimentos: matriz, espaço intermembranoso, membranas interna e externa [DiDONATO, 2000; PEDROSO, 1995; PEDROSO et al, 1997; SARASTE, 1999; SHULTZ & CHAN, 2001].

A membrana externa é facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, permitindo também a passagem de pequenos solutos, porém a membrana interna, que encerra o espaço da matriz, é impermeável à maioria das moléculas e íons, incluindo os prótons (H^+). Assim, apenas as que possuem uma proteína transportadora específica conseguem atravessar a membrana interna da mitocôndria [DiDONATO, 2000; PEDROSO, 1995; SARASTE, 1999; SHULTZ & CHAN, 2001].

Os polipeptídeos componentes da cadeia respiratória e do complexo enzimático responsáveis pela síntese de ATP estão inseridos na bicamada lipídica da membrana mitocondrial interna, em suas invaginações ou cristas, enquanto que as enzimas do ciclo do ácido cítrico, da oxidação do piruvato e dos ácidos graxos estão presentes na matriz mitocondrial [DiDONATO, 2000; SARASTE, 1999; SHULTZ & CHAN, 2001; WALLACE, 1999].

A função primária da mitocôndria é gerar ATP, sendo que os equivalentes redutores (elétrons) gerados pela oxidação do piruvato e de

ácidos graxos, além daqueles gerados através do ciclo do ácido cítrico, são transferidos para cadeia respiratória via NADH e SDH, e posteriormente para o oxigênio molecular, resultando na formação de H₂O (Figura 1) [DIDONATO, 2000; SARASTE, 1999; SHULTZ & CHAN, 2001]. A energia redutora liberada pela cadeia respiratória gera um gradiente de prótons que polariza a membrana interna da mitocôndria (pólo positivo no espaço intermembranoso), criando um gradiente eletroquímico que é usado no final da cadeia respiratória para síntese de ATP, a partir de difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico, e para prover a energia necessária para o transporte de íons e outros metabólitos através da membrana interna (Figura 1) [SARASTE, 1999; SHULTZ & CHAN, 2001; WALLACE, 1999].

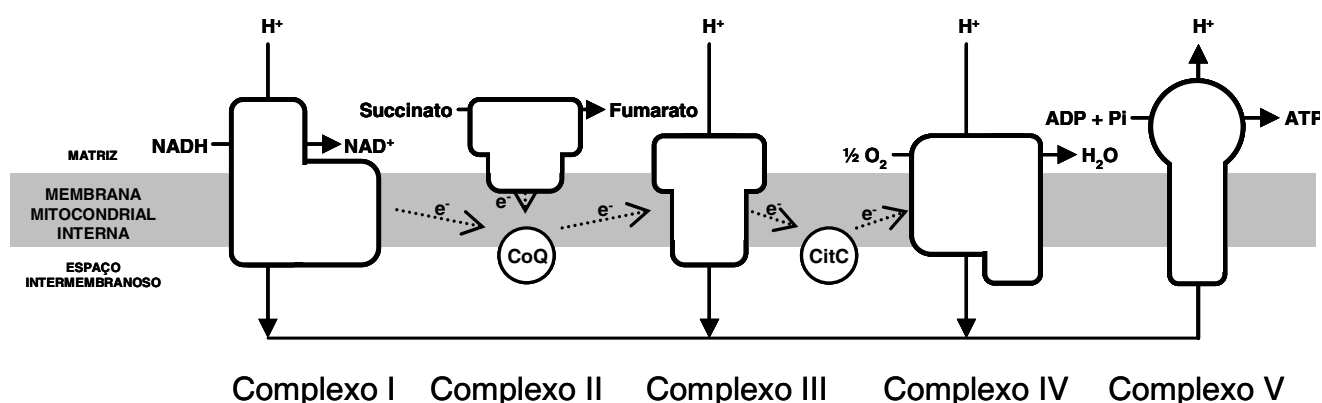


Figura 1: Representação esquemática do processo de fosforilação oxidativa na cadeia respiratória da mitocôndria. e⁻: elétron. [modificado de DIMAURO & HIRANO, 2005]

A cadeia respiratória é composta de cinco complexos enzimáticos transportadores de elétrons: complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase), complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase), complexo III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V

(ATP sintetase); e de dois pequenos transportadores móveis de elétrons: a coenzima Q_{10} (ubiquinona) e citocromo *c*. Juntos estes elementos da cadeia respiratória formam o sistema de fosforilação oxidativa responsável pela formação de ATP pela mitocôndria (Figura 1). Os complexos I e II coletam elétrons de várias fontes e os transferem para coenzima Q_{10} . Os complexos I e II colhem os elétrons produzidos pelo catabolismo dos ácidos graxos, proteínas e carboidratos e os transferem seqüencialmente para a coenzima Q_{10} . O complexo III por sua vez transporta elétrons da coenzima Q_{10} reduzida até o citocromo *c*, e o complexo IV completa a seqüência transferindo o elétron do citocromo *c* até o oxigênio molecular ($1/2O_2$) para formação de água (H_2O). A produção desse gradiente de prótons gerada pela transferência de elétrons pelos complexos I, III e IV da cadeia respiratória é utilizada pelo complexo V para condensar ADP e fosfato inorgânico na formação de ATP pela mitocôndria (Figura 1) [PEDROSO, 1995; SHULTZ & CHAN, 2001; ZEVIANE & DiDONATO, 2004].

2.2 DNA MITOCONDRIAL HUMANO

A formação dos polipeptídeos responsáveis pela cadeia respiratória da fosforilação oxidativa depende de dois sistemas genômicos separados: o genoma mitocondrial e o genoma nuclear.

A mitocôndria é a única organela que tem o seu próprio DNA. ANDERSON et al, em 1981, determinou a seqüência nucleotídica dos 16.569 pares de base (pb) e estudou a organização do genoma do DNA mitocondrial (DNAm_t). O DNAm_t humano é uma molécula circular fechada, formada por

duas cadeias, que diferem na composição das bases: a cadeia pesada (H) é rica em bases purínicas (adenina e guanina) e a cadeia leve (L) é rica em bases pirimídicas (timina e citosina). Exibe uma estrutura compacta, pois não contém íntrons, que são seqüências de DNA que são inicialmente transcritas, mas não traduzidas, pois são removidos do transcrito de RNA. O DNAm é pequeno quando comparado ao DNA nuclear (DNAn) e contém 37 genes compactados (Figura 2): dois codificam RNAs ribossômicos (rRNA 12S e 16S), 22 RNAs transportadores (tRNA) e 13 polipeptídeos [DIMAURO, 2004; ZEVIANE & DiDONATO, 2004]. Os polipeptídeos codificados pelo DNAm são subunidades da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa (Figura 2): sete subunidades do complexo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6), uma subunidade do complexo III (citocromo *b*), três subunidades do complexo IV (citocromo *c* oxidase: COXI, COXII e COXIII) e duas subunidades do complexo V (ATP sintetase 6 e 8) [ZEVIANE & DI DONATO, 2004].

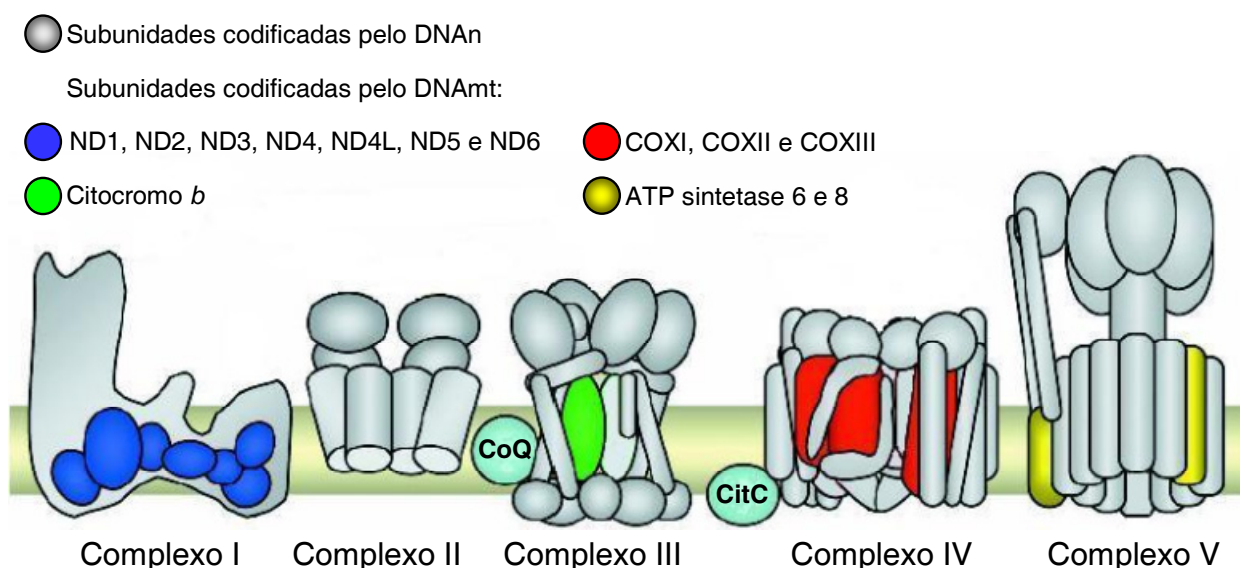
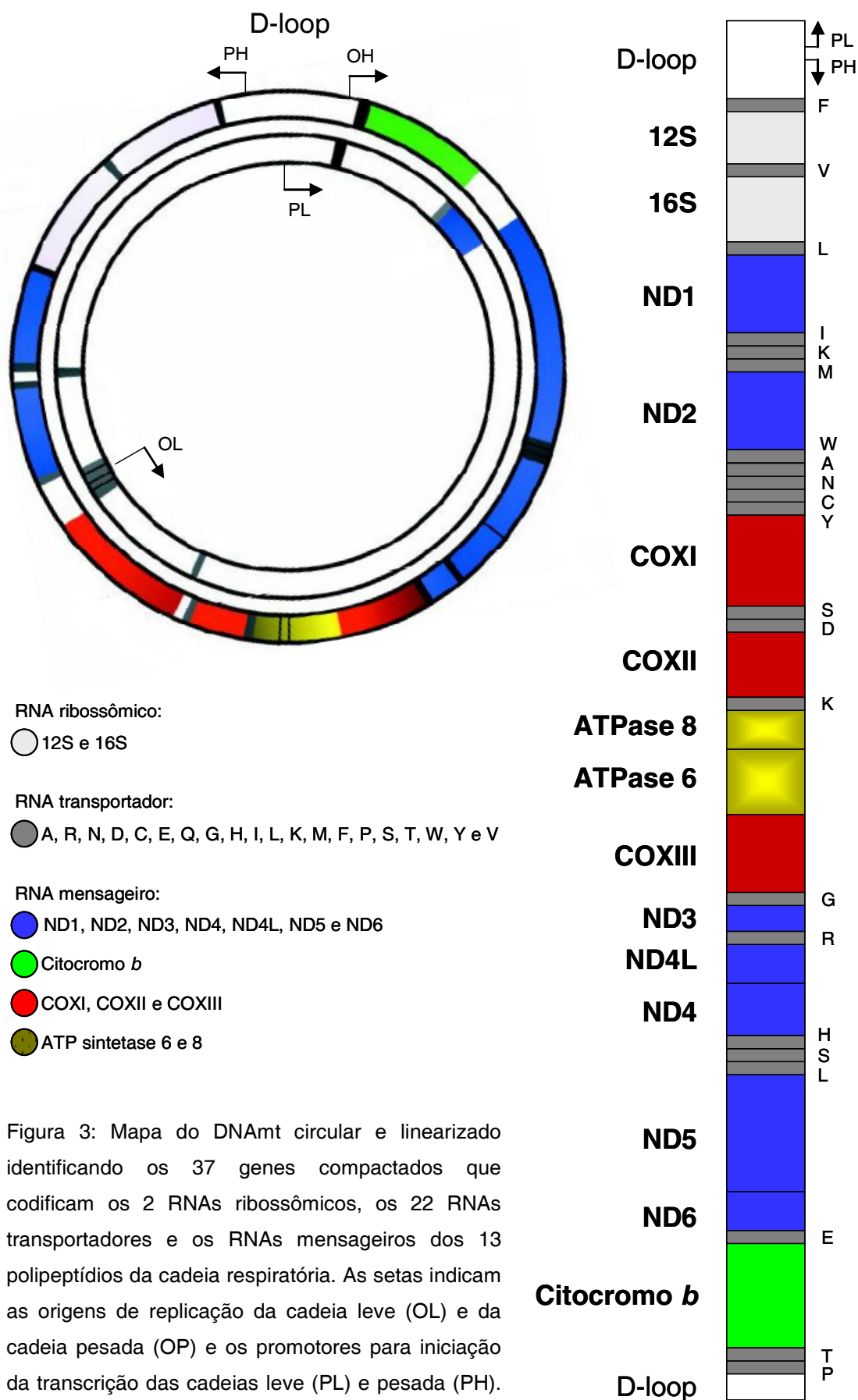


Figura 2: Identificação das subunidades da cadeia respiratória da mitocôndria codificadas pelo DNAn e DNAm. [modificado de ZEVIANI & DiDONATO, 2004]

Os polipeptídeos que são subunidades da cadeia respiratória e da fosforilação oxidativa codificados pelo DNA nuclear (DNAn) são (Figura 2): cerca de 39 subunidades do complexo I, quatro subunidades do complexo II, dez subunidades do complexo III, dez subunidades do complexo IV e cerca de treze subunidades do complexo V [ZEVIANE & DI DONATO, 2004]. As subunidades do complexo II, a coenzima Q₁₀ e o citocromo c são codificadas apenas pelo DNAn, enquanto que a formação dos complexos I, III, IV e V são codificadas pelo DNA nuclear e mitocondrial (Figura 2).

O código genético, a replicação e a transcrição do DNAm_t possuem características próprias. O código genético da mitocôndria difere do código universal nuclear: a trinca AUA codifica metionina e não isoleucina; a trinca UGA codifica triptofano e não significa a finalização da tradução (códon de parada, término ou sem sentido) e ambas as trincas AGA e AGG funcionam como códon de parada, ao invés de codificar arginina [ANDERSON et al, 1981]. O DNAm_t tem duas origens distintas de replicação, uma para cada cadeia, as quais são separadas por 2/3 do genoma (Figura 3): a origem da replicação da cadeia H (O_H) e da cadeia L (O_L). A O_H está localizada numa região do genoma mitocondrial que não tem genes conhecidos. Esta região é denominada de D-loop (displacement-loop ou alça de deslocamento), porque um segmento da cadeia-H é deslocado pelo DNA que está sendo sintetizado nessa região. A O_L localiza-se entre os nucleotídeos (nt) 5721-5781, dentro de uma região codificadora para tRNAs. A transcrição do DNAm_t ocorre na região D-loop, onde estão localizados os promotores (sítio iniciador) que iniciam a transcrição das cadeias H e L (respectivamente P_H e P_L) (Figura 3) [CLAYTON, 1991; FALKENBERG et al, 2007; HOLT et al, 2000].

Apesar da importância do DNAm, a mitocôndria depende também do DNAn para a síntese de muitas proteínas. Todas as funções essenciais como replicação, transcrição e tradução requerem fatores codificados pelo DNAn. Como a fosforilação oxidativa depende das subunidades codificadas tanto pelo núcleo como pela mitocôndria, mutações em ambos os DNA podem levar a defeitos no transporte de elétrons e síntese de ATP, causando disfunção tecidual e conseqüentemente doença humana.



2.3 GENÉTICA MITOCONDRIAL

A genética mitocondrial obedece algumas regras próprias, sendo seu funcionamento necessário para compreender a patogênese das doenças mitocondriais. A compreensão de alguns aspectos específicos das mitocôndrias é importante: herança materna, segregação na replicação, limiar na expressão fenotípica, alta taxa de mutação e acúmulo de mutações do DNAMt com a idade ou doenças degenerativas [IIZUKA & SAKAI, 2005].

A transmissão materna do DNAMt define o padrão de herança deste genoma, pois o genoma mitocondrial de um indivíduo é derivado do DNAMt presente no óvulo (Figura 4). Os espermatozóides possuem estruturas derivadas da mitocôndria que não são incorporadas ao zigoto, fazendo com que a transmissão paterna seja a exceção para o DNAMt. A importância disso está no fato de uma mulher afetada poder transmitir o defeito genético para seus filhos e filhas, porém somente as filhas poderão transmitir a doença para a geração seguinte [DiMAURO, 2004; IIZUKA & SAKAI, 2005].

Cada célula contém cerca de 100.000 mitocôndrias e cada mitocôndria apresenta de 2 a 10 cópias de DNAMt, fazendo com que, diferente dos genes nucleares que são na maioria formados por duas cópias por célula, os genes mitocondriais estejam presentes em mais de 100.000 cópias por célula [FALKENBERG et al, 2007; FERNANDEZ-SILVA et al, 2003; FINSTERER, 2006]. Cada célula dará origem a um tecido diferente durante a divisão embrionária. As mitocôndrias distribuem-se de forma aleatória nas suas células filhas durante a divisão mitótica, fazendo com que quando ocorra uma mutação do seu DNAMt as células filhas possam receber: (1) 0% do DNAMt mutante

(homoplasma normal); (2) uma proporção do DNAm mutante (heteroplasma); e (3) 100% do DNAm mutante (homoplasma mutante) (Figura 4) [DiMAURO, 2004; IIZUKA & SAKAI, 2005]. Nos indivíduos normais todas as cópias do DNAm são iguais (homoplasma). O potencial de replicação de cada linhagem celular também é fator importante na determinação da proporção relativa entre DNAm normal e mutante. Os tecidos muscular esquelético, cardíaco e neural apresentam baixa capacidade de replicação de suas células, assim estão permanentemente reciclando suas mitocôndrias, o que faz com que haja a possibilidade de acúmulo de DNAm mutante nesses tecidos [FALKENBERG et al, 2007; McDONNELL et al, 2004; SUE et al, 1998]. Já os tecidos que mantêm alta capacidade de replicação das suas células, como os hepático e hematopoético, têm possibilidade de seleção de células, eliminando aquelas com acúmulo de DNAm mutante [FALKENBERG et al, 2007; McDONNELL et al, 2004; SUE et al, 1998]. Como as células com maior proporção de DNAm mutante têm dificuldade em obter energia através oxidação fosforilativa pela disfunção mitocondrial, sua morte celular é prematura. Dessa forma tecidos com alta capacidade de replicação acumulam suas células normais, fazendo com que a cada ciclo de replicação sejam selecionadas mais células normais, ocorrendo então a segregação na replicação [FINESTERER, 2007; SUE et al, 1998].

A expressão do DNAm mutante ocorre somente quando se atinge determinada porcentagem do DNAm normal (limiar). O limiar varia dependendo da capacidade de uma mutação do DNAm causar disfunção. A proporção entre DNAm normal e mutante necessária para causar doença mitocondrial é diferente para cada tecido. A variação do limiar também ocorre

de forma diferente devido à necessidade metabólica de cada tecido não ser a mesma [IIZUKA & SAKAI, 2005]. Desse modo, sistema nervoso, pâncreas, tecido muscular esquelético e cardíaco são os tecidos mais vulneráveis, enquanto, rins e fígado apresentam menos alterações. O fenótipo celular mantém-se normal dentro de uma ampla variação de concentração do DNAm_t mutante, mas uma vez atingido o limiar crítico, o fenótipo celular muda rapidamente do normal para o patológico [FINSTERER, 2006; THORBURN & DAHL, 2001].

O DNAm_t tem uma alta taxa de mutação, 10 a 20 vezes maior que o DNAn [FINSTERER, 2006]. A necessidade energética varia durante toda a vida, sendo que com o envelhecimento a capacidade de gerar ATP pela fosforilação oxidativa decai, estando relacionada com o acúmulo de mutações no genoma mitocondrial durante o processo de envelhecimento [LINNANE et al, 1989; MEISSNER et al, 2006]. Esse acúmulo de DNAm_t mutante com o avanço da idade possivelmente ocorre devido a formação de radicais livres durante o processo de fosforilação oxidativa que começa a ser estimulado pelo processo de envelhecimento [MEISSNER et al, 2006; WALLACE, 1992]. Os tecidos com baixa capacidade de replicação acumulam DNAm_t mutante com o decorrer do tempo, fazendo com que a incidência de disfunção mitocondrial aumente com a idade nos pacientes afetados [FINSTERER, 2007].

Dessa forma, as mutações patogênicas do DNAm_t podem expressar-se de forma variável nos diferentes tecidos, dependendo da proporção relativa de DNAm_t normal e mutante, explicando porque nas doenças mitocondriais ocorre diversidade fenotípica. Ainda, todos esses fatores em conjunto contribuem para as características únicas das doenças

mitocondriais e estão intimamente ligadas à etiologia e à patogênese destas doenças.

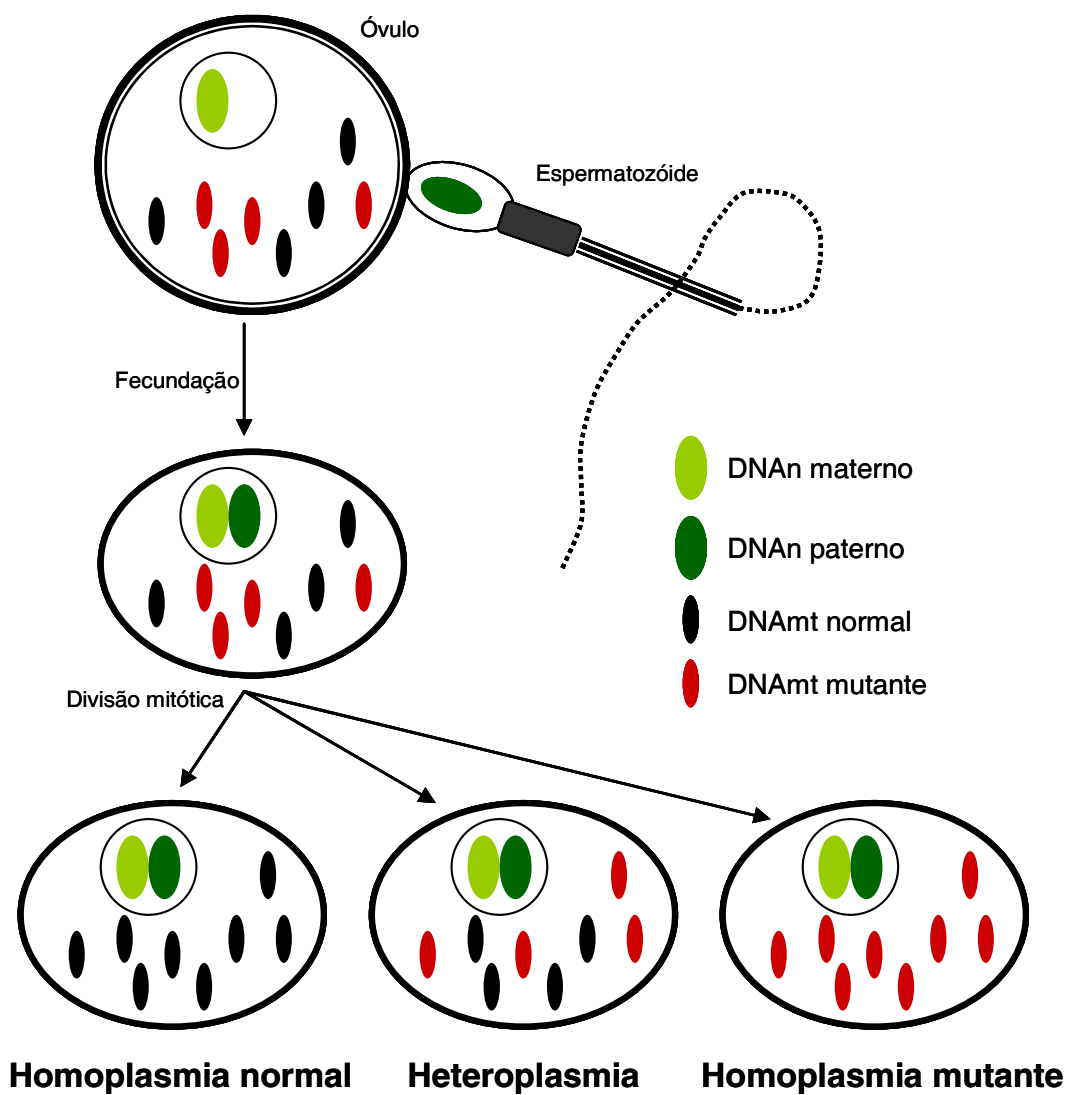


Figura 4: A transmissão materna do DNAMt e a segregação replicativa ajudando a definir o padrão de herança deste genoma (homoplasma e heteroplasma).

2.4 DOENÇAS MITOCONDRIAIS

As doenças mitocondriais, citopatias mitocondriais ou mitocondriopatias formam um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por defeitos na função mitocondrial. Estas doenças são consideradas distúrbios da fosforilação oxidativa, tendo sido descritas pela primeira vez em 1962, quando se identificou anormalidades estruturais nas mitocôndrias pela biópsia muscular de uma paciente que apresentava uma rara doença com hipermetabolismo, posteriormente chamada de doença de Luft [LUFT et al, 1962]. Durante a primeira década após a descrição deste relato, outras doenças mitocondriais foram descritas, a maioria delas individualizadas, através da presença de alterações ultraestruturais mitocondriais pela microscopia eletrônica, caracterizadas por: aumento no número e no tamanho das mitocôndrias, presença de cristas diminuídas ou aumentadas em número, associadas com alteração na sua disposição e inclusões intramitocondriais de formato retangular semelhantes a cristais (inclusões paracristalinas) [SHY & GONATAS, 1964; SHY et al, 1966].

A identificação das doenças mitocondriais foi facilitada quando ENGEL & CUNNINGHAM, em 1963, introduziram uma modificação na coloração pelo tricromo de Gomori fazendo com que a mitocôndria anormalmente proliferada em regiões intermiofibrilar e subsarcolemal fique com a cor vermelha, facilitando o diagnóstico e tornando-o mais prático que a microscopia eletrônica. Essas fibras anormais foram chamadas de “fibras granulares” ou “fibras vermelhas rasgadas”, do inglês “ragged-red fibers” (RRF), e tornaram-se o selo diagnóstico das doenças mitocondriais [OLSON et al, 1972]. As

técnicas histoquímicas de coloração do material proveniente de biópsia muscular permitiram uma melhor compreensão dessas doenças [DUBOWITZ & PEARSE, 1960]. A partir destas técnicas o diagnóstico dessas doenças foi possível pela localização dos sistemas enzimáticos em nível celular, permitindo-se correlacionar a atividade funcional de cada fibra com a sua morfologia: os agregados mitocondriais mostram uma atividade oxidativa aumentada para a enzima desidrogenase succínica (SDH), que é exclusivamente intramitocondrial, e para a enzima NADH-tetrazolium redutase [WERNECK, 1987]. Diante disso, ficou evidente que essas fibras eram frequentemente associadas com as doenças mitocondriais sendo que a partir dos anos 70, tiveram início relatos de um número crescente de doenças mitocondriais nas quais o músculo não era o único tecido afetado. As doenças mitocondriais são manifestadas por diversos sinais e sintomas, podendo a maioria ser agrupados em síndromes clínicas. As síndromes clínicas envolvendo predominantemente o sistema nervoso central ou o músculo esquelético foram descritas manifestando-se com: retardo psicomotor, crises convulsivas, hemiparesia, demência, ataxia, distúrbios do movimento, retinite pigmentosa e surdez, em várias combinações, sob o nome de encefalomiopatia mitocondrial, definida como “doenças neuromusculares com alterações mitocondriais estruturais e/ou funcionais no cérebro e/ou músculo” [SHAPIRA et al, 1977]. Assim, apesar das doenças mitocondriais serem multisistêmicas, o termo “encefalomiopatia mitocondrial” começou a ser usado naquelas condições em que a doença mitocondrial afeta preferencialmente o sistema nervoso e músculo esquelético, sendo várias as síndromes descritas onde esses tecidos são os principais

envolvidos, das quais se destacam síndromes como (Tabela 1): oftalmoplegia externa progressiva crônica (OEPC); síndrome de Kearns-Sayre; síndrome de Pearson; miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes à acidente vascular cerebral (MELAS); epilepsia mioclônica com RRF (MERRF); neuropatia, ataxia e retinopatia pigmentar (NARP); neuropatia óptica hereditária de Leber; encefalomiopatia mitocondrial neuro-gastro-intestinal (MNGIE); e síndrome de Leigh [BETTS et al, 2004; DiMAURO, 2004; ZEVIANI & DiDONATO, 2004]. Outras manifestações sistêmicas e a sobreposição dos achados clínicos entre essas síndromes também são descritos mostrando a grande variação fenotípica entre estas entidades [BETTS et al, 2004; DiMAURO, 2004; ZEVIANI & DiDONATO, 2004].

Devido a essa grande heterogeneidade fenotípica, foi proposta uma classificação bioquímica das doenças mitocondriais, com base na demonstração de deficiência enzimática em mitocôndrias isoladas do músculo esquelético. Vários autores tentaram uma classificação, de acordo com o sítio primário do defeito enzimático: defeitos no transporte do substrato (deficiência de carnitina e de carnitina palmitil-transferase); defeitos na utilização do substrato (deficiência de piruvato carboxilase, complexo da desidrogenase pirúvica e defeitos na oxidação de ácidos graxos); defeitos na cadeia respiratória (deficiência do complexo I, II, III, IV); defeitos no ciclo do ácido cítrico e na combinação oxidação-fosforilação (deficiência do complexo V e doença de Luft) [DiMAURO et al, 1985; MORGAN-HUGHES, 1986].

A tentativa de classificar essas doenças pelo sítio primário do defeito enzimático, pela bioquímica muscular, perdeu força pela sua dificuldade técnica associado ao início dos estudos genéticos que começaram a revelar

diferentes padrões de mutação do DNAMt causando defeitos da fosforilação oxidativa. Apesar do DNAMt ter sido descoberto cerca de 40 anos atrás e seu seqüenciamento completado em 1981, as mutações do DNAMt começaram a ganhar destaque em doenças humanas somente após 1988, quando foram descritas mutações do DNAMt causando doenças com alteração da fosforilação oxidativa em pacientes com neuropatia óptica hereditária de Leber, MERRF, OEPC e síndrome de Kearns-Sayre [HOLTZ et al, 1988; WALLACE et al, 1988a; WALLACE et al, 1988b; ZEVIANI et al, 1988]. A partir desse momento teve início a busca pela classificação das doenças mitocondriais através do seu defeito genético (Tabela 1). Os primeiros dois tipos de mutação patogênica descritos foram amplas deleções do DNAMt e mutações de ponto do tipo “missense” ou “de sentido trocado” (substituição de um nucleotídeo acarretando mudança de aminoácido) em subunidades das enzimas da fosforilação oxidativa, mas com a evolução das técnicas moleculares um número crescente de mutações do DNAMt foram identificadas [HOLTZ et al, 1988; WALLACE et al, 1988a; WALLACE et al, 1988b; ZEVIANI et al, 1988]. A descrição dessas mutações também proporcionou instrumentos de diagnóstico para a detecção da doença em famílias sob risco e, mais importante, forneceu subsídios para um aconselhamento genético e para a compreensão dos mecanismos moleculares das doenças mitocondriais, além de representar um primeiro passo para futuros tratamentos.

Tabela 1. Manifestações clínicas e classificação genética das principais encefalomiopatias mitocondriais.

	Fenótipo
Rearranjos do DNAm^t	
OEPC	Ptose palpebral, oftalmoparesia, fraqueza muscular
Kearns-Sayre	Ptose palpebral, oftalmoparesia, fraqueza muscular, retinopatia pigmentar, ataxia, neuropatia, cardiomiopatia, bloqueio de condução cardíaco, baixa estatura, hiperproteinorquia
Pearson	Anemia sideroblástica refratária com vacuolização dos precursores da medula óssea, insuficiência pancreática
Mutação ponto do DNAm^t	
MELAS	Episódios semelhantes à acidente vascular cerebral, encefalopatia, acidose láctica e/ou RRF
MERRF	Epilepsia, mioclônica, fraqueza muscular, RRF, ataxia cerebelar, surdez, demência
NARP	Neuropatia periférica, ataxia, retinopatia pigmentar
Leber	Perda da visão central, telangectasia peripapilar, microangiopatia
Mutação do DNAn	
Leigh	Encefalomiopatia necrotizante subaguda
MNGIE	Encefalomiopatia mitocondrial com distúrbio neuro-gastro-intestinal

DNAm^t: DNA mitocondrial; DNAn: DNA nuclear; RRF: fibras vermelhas rasgadas ou “ragged-red fibers”.

2.5 DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS

Atualmente o diagnóstico das encefalomiopatias mitocondriais pode ser confirmado principalmente por: (1) análise bioquímica mostrando deficiência das enzimas da cadeia respiratória da fosforilação oxidativa; (2) biópsia muscular com evidencia de disfunção mitocondrial nas fibras musculares (RRF); e (3) estudo molecular revelando mutações do DNAm [BERNIER et al, 2002].

A elevação desproporcional do ácido láctico durante os exercícios e durante a piora dos sintomas é uma das características das doenças que envolvem o metabolismo das mitocôndrias, porém não é específico e pode inclusive faltar, mesmo assim ainda serve para levantar a suspeita diagnóstica de disfunção mitocondrial em alguns pacientes. O ácido láctico está elevado devido ao excesso de piruvato que é reduzido pela lactato desidrogenase e pela transaminação da alanina. O piruvato oriundo dos ácidos graxos pela beta-oxidação e, do mesmo modo, os aminoácidos transaminados têm dificuldade para penetrar no ciclo do ácido cítrico, determinando aumento da concentração do piruvato, ácido láctico e alanina. O ácido láctico está aumentado em diversas doenças das mitocôndrias, não existindo padrão clínico típico para cada uma das síndromes [DIMAURO et al, 1985].

Como as mitocôndrias participam do metabolismo dos aminoácidos, dos lipídios e do ciclo do ácido cítrico, a investigação bioquímica, em músculo esquelético obtido por biópsia dos casos suspeitos, permite detectar diversas deficiências enzimáticas [DIMAURO et al, 1985; PEDROSO, 1995; PEDROSO et al,

1997]. A determinação da atividade enzimática da mitocôndria, pela dosagem de enzimas como NADH-desidrogenase, NADH-citocromo c redutase, succinato desidrogenase, succinato-citocromo c redutase e citocromo c oxidase, permite caracterizar os complexos enzimáticos deficientes na cadeia respiratória auxiliando no diagnóstico [PEDROSO et al, 1997]. As demais enzimas presentes na mitocôndria, como a citrato sintetase do ciclo do ácido cítrico, também podem ser dosadas para auxiliar a avaliação bioquímica das doenças mitocondriais. A atividade enzimática da cadeia respiratória abaixo de 30% em relação à população normal da mesma faixa etária pode ser considerada sugestiva de disfunção mitocondrial, porém a diversidade técnica para realização das dosagens em indivíduos normais e afetados não tem permitido um consenso para esse valor [BERNIER et al, 2002; WALKER et al, 1996].

A cadeia respiratória da fosforilação oxidativa também pode ser avaliada por técnicas de imunohistoquímica em biópsia de músculo, mas a atividade da citocromo c oxidase (COX) por reação histoquímica é o método que mais tem sido empregado na rotina da avaliação das fibras musculares [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; WALKER et al, 1996]. A presença de fibras com deficiência da COX, chamadas fibras musculares COX negativas (COX-), quando em frequência maior que 2% em indivíduos jovens ou 5% em qualquer idade, sugere disfunção do complexo IV da cadeia respiratória [BERNIER et al, 2002; WALKER et al, 1996].

Contudo, a presença de RRF ainda é o selo diagnóstico das doenças mitocondriais na biópsia muscular. As RRF refletem a proliferação de mitocôndria defeituosa visualizada pela coloração do tricromo de Gomori

modificado (TGM) ou pela reação histoquímica para desidrogenase succínica (SDH). A identificação de qualquer RRF em um paciente jovem, com menos de 30 anos, é sugestiva de doença mitocondrial e níveis acima de 2% podem ser considerados diagnósticos em qualquer idade [WALKER et al, 1996]. A presença de acúmulo subsarcolemal de mitocôndrias nas fibras musculares também deve ser considerada no diagnóstico das doenças mitocondriais na infância, uma vez que, esse acúmulo subsarcolemal pode ser mais comum do que a presença das RRF no músculo de crianças [BERNIER et al, 2002]. As RRF são distribuídas randomicamente, mas com discreto predomínio em fibras do tipo I, há significativa porcentagem em pacientes com OEPC, menor porcentagem em pacientes com MELAS e MERRF, e pode estar ausentes em pacientes com síndrome de Leigh [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; COLLINS et al, 1995]. A presença de RRF em pequena porcentagem pode ser encontrada em pacientes com idade avançada e naqueles com doenças não mitocondriais como isquemia muscular, distrofia muscular de Duchenne, distrofia miotônica, paralisia periódica ou polimiosite, e também, secundária ao uso de medicações, como a terapira anti-retroviral com os inibidores da transcriptase reversa [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; SCOLA et al, 2007; WALKER et al, 1996].

As mutações do DNAm causadoras de doenças podem variar desde a alteração de um único par de bases até a deleção de milhares de pares de bases. Atualmente as doenças mitocondriais podem ser classificadas segundo o tipo de mutação do DNAm em: (1) rearranjos (deleção ou inserção de um segmento do DNA); e (2) mutação de ponto (substituição de um único nucleotídeo do DNA).

As mutações por rearranjos do DNAm são geralmente casos esporádicos [ZEVIANE & DiDONATO, 2004]. Os três principais fenótipos de doença mitocondrial associados com esse tipo de mutação são: OEPC, síndrome de Kearns-Sayre e síndrome de Pearson [DiMAURO, 2004; ZEVIANE & DiDONATO, 2004]. A presença de mutações de ponto pode ocorrer nessas síndromes, porém os estudos mostram menor incidência desse tipo de mutação nesse grupo de pacientes. As mutações de ponto estão principalmente associadas com padrão de herança materno, sendo os principais fenótipos associados com esse tipo de mutação: MELAS, MERRF, NARP e neuropatia óptica hereditária de Leber [DiMAURO, 2004; ZEVIANE & DiDONATO, 2004].

Como descrito anteriormente, ocorre nas doenças mitocondriais a segregação replicativa. Isso faz com que o DNAm mutante seja mais encontrado em tecidos com baixa capacidade de replicação. Dessa forma, a pesquisa das mutações tem obtido melhores resultados quando as amostras do DNAm pesquisadas são provenientes, por exemplo, de músculo estriado esquelético, células do epitélio urinário ou folículos capilares [FINESTERER, 2007; McDONNELL et al, 2004; SUE et al, 1998]. Assim, a ausência de mutações do DNAm quando a pesquisa foi realizada em tecidos de alta capacidade replicativa, como em leucócitos do sangue periférico, não afasta a possibilidade do paciente ter a mutação [FINESTERER, 2007; McDONNELL et al, 2004; SUE et al, 1998].

2.6 MELAS

2.6.1 Histórico

Os primeiros pacientes cujo quadro clínico sugeria a síndrome de MELAS começaram a ser descritos a partir de 1975, onde os pacientes apresentavam doença mitocondrial cujo ponto comum era a presença de miopatia mitocondrial associada a alteração cerebral, como retardo mental, convulsões, mioclonia, oftalmoplegia, retinite pigmentar, cegueira, calcificação nos gânglios da base e hemiplegias súbitas sugestivas de acidentes vasculares cerebrais [KOENIGSBERGER et al, 1976; SHAPIRA et al, 1975]. Nos anos seguintes outros casos com achados semelhantes foram somados a literatura, e a partir deles em 1984, PAVLAKIS et al, caracterizaram melhor os pacientes que possuíam desenvolvimento inicial normal, baixa estatura, convulsões, hemiparesia alternante, hemianopsia e cegueira cortical, por meio do quadro que denominaram MELAS, do inglês *Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes*, isto é, miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral.

No Brasil, o primeiro relato de MELAS foi feito por WERNECK et al, em 1987, ao descrever um menino que apresentava episódios recorrentes de crise convulsiva, cefaléia e vômitos associados com sinais neurológicos focais, do qual a investigação mostrou tomografia computadorizada de crânio com lesões semelhantes a acidente vascular cerebral isquêmico e calcificação dos gânglios da base, biópsia muscular com RRF, elevação do

ácido láctico e dosagem da atividade das enzimas da cadeia respiratória compatível com deficiência do complexo IV.

2.6.2 Critérios diagnósticos

Os casos previamente publicados na literatura internacional com diagnóstico sugestivo de MELAS foram revisados por HIRANO et al, em 1992, com a finalidade de obter critérios diagnósticos para esse grupo de pacientes. Após essa revisão da literatura, os critérios diagnósticos de MELAS passaram a incluir obrigatoriamente as seguintes manifestações: (1) sinais de encefalopatia, frequentemente com demência e crises convulsivas; (2) episódios semelhantes a acidente vascular cerebral em idade jovem; e (3) evidência bioquímica de disfunção mitocondrial, como acidose láctica ou RRF na biópsia muscular. O diagnóstico pode ainda ser considerado mais seguro se estiver presente pelo menos duas das seguintes alterações: desenvolvimento normal, cefaléia ou vômitos recorrentes [HIRANO et al, 1992]. A principal manifestação desse grupo de pacientes com doença mitocondrial é a presença dos episódios semelhantes a acidente vascular cerebral em idade jovem, mas outras alterações multisistêmicas são encontradas: alteração da motilidade ocular, intolerância ao exercício, retinopatia pigmentar, surdez, baixa estatura, diabetes mellitus, alteração da condução cardíaca, cardiomiopatias, alterações gastrointestinais, entre outras [GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992].

2.6.3 Correlação entre as alterações clínicas e a fisiopatologia

Clinicamente os episódios semelhantes a acidente vascular cerebral apresentado pelos pacientes com MELAS são indistinguíveis daqueles apresentados por pacientes com acidente vascular cerebral isquêmico, porém a patogênese destas lesões em pacientes com MELAS não está completamente esclarecida, sendo consideradas duas principais hipóteses: (1) isquêmica, a qual sugere a presença de uma “angiopatia mitocondrial” causada por disfunção mitocondrial nas células musculares lisas dos pequenos vasos cerebrais levando a oclusão vascular com perda neuronal [GOTO, 1995; MIZUKAMI et al, 1992; OHAMA et al, 1987; SAKUTA & NONAKA, 1989]; e (2) metabólica, a qual sugere que uma “citopatia mitocondrial” provocaria a falência energética do tecido cerebral causando a lesão neuronal [GILCHRIST et al, 1996; IIZUKO et al, 2002; SPARACO et al, 1993].

A hipótese isquêmica é baseada principalmente nos estudos por microscopia eletrônica que mostraram células musculares lisas e endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos cerebrais com mitocôndrias aumentadas em tamanho e número nas regiões dos episódios semelhante à AVC, diante disso, acreditou-se inicialmente que as lesões do sistema nervoso central dos pacientes com MELAS corresponderiam somente à disfunção vascular pela proliferação anormal das mitocôndrias na parede dos vasos cerebrais provocando isquemia tecidual [GOTO, 1995; MIZUKAMI et al, 1992; OHAMA et al, 1987; SAKUTA & NONAKA, 1989; TAHANASHI et al, 2000]. Contudo, as análises radiológicas e arteriográficas revelaram que as lesões não obedecem a um território vascular específico mostrando que um possível mecanismo

metabólico poderia estar mais relacionado com as lesões do que o mecanismo isquêmico. Ainda, estudos mostrando tanto a presença de áreas de hipoperfusão como de hiperperfusão cerebral estão presentes na literatura, mostrando a dificuldade na compreensão do mecanismo fisiopatológico dessas lesões [HAAS & DIETRICH, 2004; IIZUKA et al, 2003; NISHIOKA et al, 2008]. Assim, a possibilidade de distúrbio funcional desses pequenos vasos cerebrais, por desregulação do mecanismo de vasodilatação e vasoconstrição, vem sendo afastada pela normalidade da vasoreatividade das arteríolas cerebrais dos pacientes com MELAS, também ao estudo vascular por doppler transcraniano [MOLNAR et al, 2000]. A avaliação por ressonância nuclear magnética com difusão mostra aumento dos valores do coeficiente de difusão nas lesões semelhante a acidente vascular cerebral em pacientes com MELAS, em contraste com o coeficiente de difusão diminuído que ocorre em pacientes com acidentes vascular cerebral de origem isquêmica, sugerindo a presença de edema vasogênico ao contrario do edema citotóxico encontrado no AVC de origem isquêmica, contribuindo para a possibilidade de que um mecanismo metabólico esteja associado com esses episódios [ABE et al, 2004; KOLB et al, 2003; OPPENHEIM et al, 2000; YONEDA et al, 1999;].

Atualmente, os mecanismos que desencadeiam esses episódios estão sendo correlacionados com uma combinação dessas duas hipóteses, onde eventos neurovasculares não isquêmicos iniciados pela hiperexcitabilidade neuronal, no qual tanto uma disfunção neuronal quanto vascular são responsáveis pela patogênese dos episódios semelhantes à AVC (Figura 5). Nesse mecanismo, são destacados a hiperexcitabilidade neuronal; o

aumento da permeabilidade capilar causando edema vasogênico e hiperemia focal; e a vulnerabilidade dos neurônios nas áreas envolvidas [IIZUKO et al, 2002]. A hiperexcitabilidade neuronal, possivelmente causada por um desequilíbrio iônico (cálcio ou potássio) provocando atividade epileptiforme e cefaléia, potencialmente iniciaria a cascata de eventos que levariam ao episódio semelhante à AVC [IIZUKO & SAKAI, 2005]. A presença de crises convulsivas do tipo clônica ou mioclônica com correlação eletroencefalográfica é maior durante os episódios semelhantes à AVC em pacientes com MELAS do que naqueles com AVC isquêmico [CANAFOLIA et al, 2001; FUJIMOTO et al, 1999]. A hiperexcitabilidade dos neurônios se desenvolve em determinadas regiões cerebrais, como resultado da presença de disfunção mitocondrial, podendo também ser responsável pelo aumento da permeabilidade capilar provocando o edema vasogênico encontrado nos pacientes com MELAS [IIZUKO & SAKAI, 2005]. A presença de crises convulsivas, focais mais do que generalizadas, também é elevada na fase subaguda e crônica da doença [CANAFOLIA et al, 2001; FUJIMOTO et al, 1999]. Isso pode explicar em parte a incidência elevada de crises convulsivas nesse grupo de pacientes, uma vez que a disfunção metabólica da fosforilação oxidativa na superfície cortical causando desequilíbrio iônico (cálcio) poderia deixar o limiar dos neurônios dessas áreas mais suscetíveis para iniciar as descargas epileptiformes [BETTS et al, 2006; RIBACODA et al, 2006]. A disfunção mitocondrial poderia ser responsável pelo edema vasogênico reversível através dos seguintes mecanismos: (1) dilatação dos pequenos vasos cerebrais por anormalidade nas células musculares lisas; e (2) disfunção do endotélio capilar levando ao aumento da sua permeabilidade [FINSTERER,

2006; IIZUKO et al, 2002]. Como a oxidação fosforilativa esta geneticamente prejudicada, a produção de ácido láctico encontra-se aumentada também no tecido cerebral diminuindo progressivamente o pH nas células musculares lisas dos vasos podendo resultar em vasodilatação, e conseqüentemente, hiperemia [IIZUKO et al, 2002]. A persistência do ácido láctico elevado de forma crônica nesses pacientes também foi estudada para explicar essas duas hipóteses, pois a acidose láctica pode piorar lesões isquêmicas, mas a relação entre essa acidose e lesão neuronal permanece controversa em pacientes com MELAS [IIZUKA & SAKAI, 2005]. As possíveis causas de vulnerabilidade desses neurônios esta relacionada com desequilíbrio iônico intracelular (cálcio), utilização menos eficiente do oxigênio e síntese de ATP diminuída [IIZUKA & SAKAI, 2005]. A disponibilidade de ATP é limitada em pacientes com MELAS. Diante disso, um aumento da demanda de energia, necessária para o funcionamento de determinada população de neurônios, cria um balanço negativo entre a necessidade e disponibilidade de ATP, causando perda neuronal particularmente nos neurônios suscetíveis [IIZUKO et al, 2002].

Os estudos radiológicos convencionais de crânio, como tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética, em pacientes com MELAS revelam alterações de substância cinzenta maior que a branca, podendo predominar em lobos occipital, parietal e temporal, que simulam AVC isquêmico [HAAS & DIETRICH, 2004; IIZUKA & SAKAI, 2005]. A maioria das lesões ocorre na região cortical dos hemisférios cerebrais e mais raramente em cerebelo ou gânglios da base [HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. Contudo, essas áreas não obedecem a um território vascular cerebral e os estudos

angiográficos mostram que os vasos nas regiões afetadas estão p rvios e algumas vezes dilatados [HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. A ressonância nuclear magnética de crânio revela que na fase aguda a lesão tem início na região temporal de forma focal, mas em 2 a 3 semanas pode progredir para as regiões parietais e occipitais, em um terço dos pacientes [IIZUKA et al, 2003]. Isso mostra que mesmo depois do episódio semelhante ao AVC o processo patológico continua progredindo [IIZUKA et al, 2003]. A mudana do padrão da concentrao do ácido l tico entre essas regiões, durante a evoluo clínica dos episódios semelhantes ao AVC, também foi observada em pacientes com MELAS [KAMADA et al, 2001]. Esses achados podem significar que a vulnerabilidade dos neurônios a disfuno mitocondrial pode ser maior nessas regiões. O mecanismo exato de predileo da doena por certas localizaes no sistema nervoso central não foi elucidado, mas a possibilidade de heteroplasmia do tecido cerebral foi afastada pelos estudos genéticos comparando tecido de diferentes áreas do cérebro [BETTS et al, 2006; GILCHRIST et al, 1996; IIZUKA & SAKAI, 2005]. Estudos com uso da espectroscopia mostram aumento de ácido l tico na fase aguda das lesões enquanto que o uso de ressonância nuclear magnética por difusão pode revelar aumento dos valores do coeficiente de difusão, sendo ambos os métodos mais sensíveis que os convencionais na fase aguda da lesão [ABE et al, 2004; HAAS & DIETRICH, 2004; OPPENHEIM et al, 2000]. As imagens de ressonância nuclear magnética são compatíveis com necrose laminar subcortical na fase subaguda dos episódios [IIZUKA et al, 2003].

A presena de múltiplas áreas focais de necrose cortical associados com atrofia cortical difusa, tanto nos hemisférios cerebrais como no cerebelo,

são os achados patológicos mais freqüentes no cérebro de pacientes com MELAS, enquanto que o tronco cerebral se encontra raramente afetado [HIRANO & PAVLAKIS, 1994; TANAHASHI et al, 2000]. A presença de atrofia cortical e calcificações em gânglios da base também são encontradas na progressão de alguns pacientes [TAHANASHI et al, 2000].

A evolução clínica dos episódios semelhantes ao AVC é mais benigna, com melhora dos sintomas em alguns meses, porém os sintomas relacionados com a encefalopatia, como demência e crise convulsiva, podem piorar progressivamente [IIZUKA et al, 2002; IIZUKA & SAKAI, 2005]. A presença de demência progressiva também tem sido encontrada associada com alteração da perfusão cerebral mesmo na ausência do episódio semelhante ao AVC, mas com atrofia cortical marcada na fase crônica da doença caracterizando perda neuronal, semelhante ao que ocorre na demência vascular [NISHIOKA et al, 2008].

Os astrócitos, durante a ativação neuronal fisiológica e a transmissão glutamatérgica, podem produzir ácido láctico que é transformado nos neurônios em piruvato para ser utilizado na fosforilação oxidativa [TSACOPOLOS & MAGISTRETTI, 1996]. Isso explica porque a estimulação neuronal de forma transitória aumenta os níveis de ácido láctico, enquanto que, se realizada de forma prolongada e contínua diminui seus níveis [SAPPEY-MARINIER et al, 1993]. A depressão alastrante cortical de Leão, evento diretamente relacionado com o início das crises de migrânea, é o exemplo mais efetivo de estimulação cortical persistente e duradoura, que também está diretamente relacionado com a hiperexcitabilidade dos neurônios. Este evento é capaz de aumentar significativamente os níveis de ácido láctico,

traduzindo desta maneira uma importante disfunção mitocondrial durante a fosforilação oxidativa dos pacientes com migrânea [MOSKOWITZ et al, 1993]. As técnicas de ressonância nuclear magnética por espectroscopia encontraram uma redução na fosforilação oxidativa e aumento do ácido láctico em pacientes com migrânea com e sem aura [BARBIROLI et al, 1992; KUWABARA et al, 1994; WATANABE et al, 1996]. A presença de crises convulsivas e cefaléia recorrente são os achados mais freqüentes durante o episódio semelhante à AVC em pacientes com MELAS, podendo ter intensidade maior quando ocorrem concomitantes com esses episódios, sendo que os episódios de cefaléias nesses pacientes podem ser indistinguíveis da migraña [IIZUKA et al, 2002; IIZUKA & SAKAI, 2005]. A presença de deficiência de COX e DNAm^t mutante em grande quantidade nos vasos da leptomeninge e córtex cerebral de pacientes com MELAS sugerem que pode existir uma ligação anormal entre atividade neuronal e a circulação vascular cerebral nesses pacientes, possivelmente por angiopatia mitocondrial capilar causando extravasamento de plasma, o que estimularia o primeiro ramo do nervo trigêmeo que inerva os pequenos vasos próximos da lesão semelhante a AVC [BETTS et al, 2006; IIZUKA & SAKAI; 2005]. Essa ligação anormal pode ser importante durante as crises de cefaléia podendo aumentar o risco de desenvolver pequenas áreas de disfunção metabólica durante a fosforilação oxidativa em regiões da superfície cortical, causando maior desequilíbrio iônico principalmente durante a depressão alastrante cortical de Leão, explicando a maior incidência e a recorrência de cefaléia nos pacientes com MELAS [BETTS et al, 2006]. A atividade neuronal anormal demonstrada por registro

eletroencefalográfico na região occipital também foi observada durante episódios de cefaléia em pacientes com MELAS [FUJIMOTO et al, 1999].

Dessa forma, IIZUKO & SAKAI em 2005 propuseram um possível mecanismo de formação dos episódios semelhantes à AVC em pacientes com MELAS, com base nos principais achados patológicos relacionados com esses episódios (Figura 5): cefaléia, crises convulsivas, hiperemia focal, edema vasogênico, progressão da lesão após o episódio semelhante à AVC e perda neuronal.

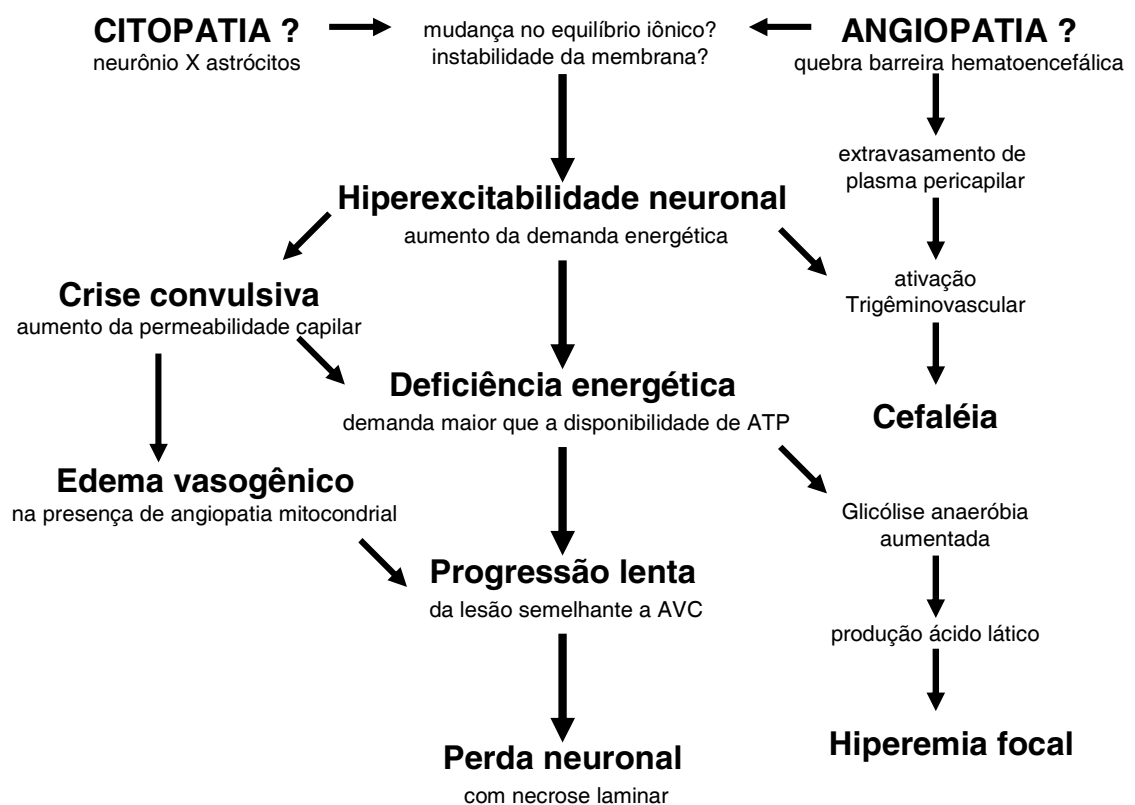


Figura 5: Mecanismo fisiopatológico proposto por IIZUKA & SAKAI (2005) para explicar os episódios semelhantes à AVC em pacientes com MELAS.

O envolvimento cardíaco pode acometer até 50% dos pacientes com MELAS, sendo as principais alterações relacionadas com fenômeno de pré-excitação, bloqueio atrioventricular, arritmias e miocardiopatia hipertrófica (especialmente a hipertrofia ventricular esquerda) que progride ao longo dos anos para miocardiopatia dilatada, porém as alterações cardíacas não são as principais manifestações clínicas da doença [HIRANO & PAVLAKIS, 1994; OKAJIMA et al, 1998]. Os estudos por cintilografia mostram sinais sugestivos de hipoperfusão cardíaca, porém a arteriografia desses pacientes mostra artérias coronárias dentro dos limites da normalidade, semelhante ao encontrado na arteriografia cerebral [SATO et al, 1994]. A biópsia de miocárdio de pacientes com MELAS demonstra RRF no músculo cardíaco na coloração pelo TGM e aumento do número e tamanho das mitocôndrias no endotélio vascular cardíaco pela microscopia eletrônica, comprovando a presença de proliferação mitocondrial anormal nesse grupo de pacientes [CONFORTO et al, 2007]. Os estudos bioquímicos da cadeia respiratória em músculo cardíaco demonstraram redução da atividade do complexo I em alguns pacientes, porém o número de casos em que os estudos foram feitos é limitado [SATO et al, 1994].

A perda auditiva, ou surdez, é uma característica bem reconhecida das doenças que acometem o DNAm. Assim, pacientes com mutação de ponto como A1555G ou A3243G estão mais suscetíveis a perda auditiva, sendo sua gravidade relacionada com a porcentagem do DNAm mutante no tecido e a exposição a agentes ototóxicos, como os aminoglicosídeos [CHINNERY et al, 2000; DESCHAUER et al, 2001; ESTIVILL et al, 1998; FISCHER-GHODSIAN, 1998; SUE et al, 1998]. A formação das células ciliadas e da estria vascular da cóclea

também são pós-mitóticas, ou seja, suas células têm baixa capacidade de replicação [KARKOS et al, 2004; LIGHTOWLERS et al, 1997]. Também, a estria vascular necessita alta demanda de ATP para manter o funcionamento fisiológico da audição [KARKOS et al, 2004; LIGHTOWLERS et al, 1997]. Dessa forma, a fisiopatologia da perda auditiva parece estar relacionada com a demanda de ATP que se encontra deficiente nesses pacientes, sendo insuficiente para manter a fisiologia coclear, devido a disfunção causada pela mutação do DNAm^t [CHINNERY et al, 2000; KARKOS et al, 2004; SUE et al, 1998]. Na maior parte dos pacientes com MELAS, uma súbita e progressiva perda da acuidade auditiva bilateral ocorre geralmente em associação com os episódios semelhantes à AVC, diferente dos pacientes com outras doenças mitocondriais, como a OEPC, onde a perda auditiva é progressiva, sendo que a perda auditiva também pode ser a primeira manifestação da doença em alguns casos [CHINNERY et al, 2000; HIRANO & PAVLAKIS, 1994; KARKOS et al, 2004; SUE et al, 1998]. Isso contribui na hipótese de que uma disfunção isquêmica ou metabólica aguda comprometendo a estria vascular possa causar perda funcional irreversível das células ciliadas da cóclea causando perda auditiva nesse grupo de pacientes [CHINNERY et al, 2000; SUE et al, 1998].

2.6.4 Genética mitocondrial

Em 1990, GOTO et al e KOBAYASHI et al, descreveram uma mutação ponto do DNAm^t afetando o gene que codifica o RNA transportador de leucina (UUR) (tRNA^{Leu(UUR)}) na posição 3243 pela troca do nucleotídeo A por G (A3243G) no músculo de pacientes com MELAS. O gene tRNA^{Leu(UUR)},

também conhecido como MTTL1, esta localizado entre os nucleotídeos 3230 e 3304, sendo responsável pela decodificação dos códons UUR (R = A ou G) [FINESTERER, 2007]. A mutação A3243G afeta a estabilidade da estrutura, metilação, aminoacilação e reconhecimento do códon do tRNA^{Leu(UUR)}, de forma mais acentuada do que outras mutações no mesmo gene [FINESTERER, 2007; HAO et al, 2004; IIZUKA & SAKAI, 2005]. Isso poderia levar a redução do nível funcional de tRNA^{Leu(UUR)} que participa do processo de síntese de proteína mitocondrial [IIZUKA & SAKAI, 2005]. Após essa primeira descrição outros estudos demonstraram que a mutação A3243G era responsável pela maioria dos casos de MELAS [CIAFALONI et al, 1992; GOTO et al, 1992; HAMMANS et al, 1991].

No ano seguinte a descoberta da mutação A3243G, uma segunda mutação ponto pela substituição do nucleotídeo T por C na posição 3271 (T3271C) do gene do tRNA^{Leu(UUR)} do DNAm também foi encontrada em pacientes com MELAS [GOTO et al, 1991]. No decorrer dos anos, outras mutações de ponto no DNAm foram encontradas em pacientes com MELAS (Tabela 2), revelando sua heterogeneidade genética. No entanto, a mutação A3243G permanecia responsável por cerca de 80% dos pacientes com MELAS e a T3271C por aproximadamente 7,5%, porém até 10% dos pacientes com MELAS podem persistir sem identificação de mutação do DNAm [ABU-AMERO et al, 2006; BATAILLARD et al, 2001; BLAKELY et al, 2005; CAMPOS et al, 1997; CAMPOS et al, 2000; CRIMI et al, 2003; CORONA et al, 2001; DE COO et al, 1999; GOTO, 1995; GOTO et al, 1994; HANNA et al, 1998; KIRBY et al, 2004; KOBAYASHI et al, 1990; LIOLITSIA et al, 2003; MANFREDI et al, 1995; MANFREDI et al, 1996; MENOTTI et al, 2004; MORTEN et al, 1993; NAINI et al, 2005; NAKAMURA et al, 1995; NISHINO et al, 1996; RAVN et al, 2001; SAKUTA et al, 2002; SANTORELLI, et al,

1997; SATO et al, 1994; TAY et al, 2005; TAYLOR et al, 1996; TZEN et al, 2003; ZEVIANI et al, 1993]. A presença de mutação por rearranjo do tipo deleção, pequena ou grande, do DNAm_t raramente foi descrita associada com fenótipo de MELAS [CAMPOS et al, 1995; DE COO et al, 1999; ROSSMANITH et al, 2008].

Apesar da maioria dos pacientes com MELAS ter a mutação ponto A3243G, essa mutação não é específica para esse grupo de pacientes, pois também foi encontrada em pacientes com OEPC, cardiomiopatias, surdez neurossensorial e diabetes mellitus com herança materna [ZEVIANI & DIDONATO, 2004]. Além disso, a avaliação clínica e laboratorial tem encontrado familiares acometidos de forma incompleta para MELAS, geralmente com padrão de herança materna. No entanto, o estudo genético tem mostrado que familiares maternos clinicamente assintomáticos, com a mutação A3243G, também podem ter disfunção mitocondrial com presença de RRF na biópsia muscular [CIAFALONI et al, 1992; HIRANO et al, 1992]. Ainda, pacientes com MELAS concomitante com outras doenças mitocondriais como MERRF, síndrome de Leigh ou neuropatia óptica hereditária de Leber, tem sido relatados associados à mutação do DNAm_t [BLAKELY et al, 2005; CAMPOS et al, 1997; CRIMI et al, 2003; LIOLITSIA et al, 2003; MELONE et al, 2004; NAINI et al, 2005; NAKAMURA et al, 1995; ZEVIANI et al, 1993]. Esses dados contribuem para afirmar que as doenças mitocondriais causadas por mutação ponto do DNAm_t possuem fenótipo heterogêneo [GOTO, 1995].

Tabela 2. Mutações associadas com fenótipo de MELAS.

Mutação	Gene	Referência
do tipo ponto:		
nt-583 (G>A)	tRNA-Phe	Hanna et al. (1998)
nt-1642 (G>A)	tRNA-Val	Taylor et al. (1996)
nt-1644 (G>A)	tRNA-Val	Menotti et al. (2004)
nt-3243 (A>G)	tRNA-Leu(UUR)	Goto et al. (1990) Kobayashi et al (1990)
nt-3252 (A>G)	tRNA-Leu(UUR)	Morten et al. (1993)
nt-3256 (C>T)	tRNA-Leu(UUR)	Sato et al. (1994)
nt-3260 (A>G)	tRNA-Leu(UUR)	Nishino et al. (1996)
nt-3271 (T>C)	tRNA-Leu(UUR)	Goto et al. (1991)
nt-3291 (T>C)	tRNA-Leu(UUR)	Goto et al. (1994)
nt-3308 (T>C)	ND1	Campos et al. (1997) ¹
nt-3376 (G>A)	ND1	Blakely et al. (2005) ²
nt-3697 (G>A)	ND1	Kirby et al. (2004)
nt-3946 (G>A)	ND1	Kirby et al. (2004)
nt-3949 (T>C)	ND1	Kirby et al. (2004)
nt-4332 (G>A)	tRNA-Gln	Bataillard et al. (2001)
nt-5814 (A>G)	tRNA-Cys	Manfredi et al. (1996)
nt-7512 (T>C)	tRNA-Ser(UCN)	Nakamura et al. (1995) ³
nt-8296 (A>G)	tRNA-Lys	Sakuta et al. (2002) ¹
nt-8316 (T>C)	tRNA-Lys	Campos et al. (2000)
nt-8356 (T>C)	tRNA-Lys	Zeviani et al. (1993) ³
nt-9957 (T>C)	COXIII	Manfredi et al. (1995)
nt-12147 (G>A)	tRNA-His	Melone et al. (2004) ³
nt-12299 (A>C)	tRNA-Leu(CUN)	Abu-Amero et al. (2006)
nt-12770 (A>G)	ND5	Liolitsa et al. (2003)
nt-13042 (A>T)	ND5	Naini et al. (2005) ³
nt-13045 (A>C)	ND5	Liolitsa et al. (2003) ^{4, 5}
nt-13084 (A>T)	ND5	Crimi et al. (2003) ⁴
nt-13513 (G>A)	ND5	Santorelli et al. (1997)
nt-13514 (G>A)	ND5	Corona et al. (2001)
nt-14453 (G>A)	ND6	Ravn et al. (2001)
nt-14693 (A>G)	tRNA-Glu	Tzen et al. (2003)
do tipo rearranjo:		
deleção simples (1pb)	COXII	Rossmannith et al. (2008)
deleção simples (4pb)	Cyt b	De Coo et al. (1999) ⁵
deleção simples (6000pb)	COXI, COXII, COXIII, ND3, ND4, ND4L, ATPs 6 e 8	Campos et al. (1995) ⁶

Fenótipo de MELAS concomitante com: ¹: necrose estriatal bilateral; ²: neuropatia óptica hereditária de Leber; ³: MERRF; ⁴: síndrome de Leigh; ⁵: parkinsonismo; ⁶: anemia de Fanconi.

2.6.5 Alterações laboratoriais e bioquímicas

O nível do ácido láctico no sangue e no líquido cefalorraquiano (LCR) está elevado durante ou logo após os episódios semelhantes à AVC em praticamente todos os pacientes com MELAS [GOTO et al, 1992]. O nível do ácido láctico ventricular, medido pela espectroscopia, costuma estar aumentado na maioria dos pacientes com MELAS, e em seus familiares, e esse aumento está associado com maior gravidade do quadro neurológico [KAUFMANN et al, 2004]. Outros exames podem ser usados na investigação, como dosagens de creatina quinase (CK) ou a eletroneuromiografia, porém seus resultados são inespecíficos para MELAS, auxiliando principalmente no seu diagnóstico diferencial com outras doenças. Assim, apesar de ser inespecífica para demonstrar miopatia mitocondrial, a dosagem sérica da CK pode encontrar-se levemente aumentada em alguns pacientes usualmente durante ou após os episódios semelhantes a acidente vascular cerebral, auxiliando a demonstrar o acometimento muscular nesses pacientes [GOTO et al, 1992].

Os estudos bioquímicos mostram que diversos complexos podem estar deficientes de forma isolada ou combinada, mas o complexo I parece ser o mais envolvido da cadeia respiratória em pacientes com MELAS, geralmente associado com alterações de outros complexos da cadeia respiratória, enquanto que o complexo II parece ser o menos afetado. [CIAFALONI et al, 1992; GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994; KOBAYASHI et al, 1986]. Isso pode ser observado também pelo fato de pacientes com MELAS que possuem a mutação ponto A3243G apresentarem

RRF com reação histoquímica normal para COX na biópsia muscular, em contraste aos pacientes com OEPC, com a mutação ponto A3243G, que apresentam grande incidência de fibras RRF com deficiência de atividade da COX [GOTO, 1995]. A relação entre os defeitos do complexo I da cadeia respiratória e o fenótipo de MELAS é sugerido também pela identificação de mutações dos genes ND do DNAm, codificadores de subunidades do complexo I, em pacientes com MELAS [BLAKELY et al, 2005; CAMPOS et al, 1997; CORONA et al, 2001; CRIMI et al, 2003; KIRBY et al, 2004; LIOLITSA et al, 2003; NAINI et al, 2005; RAVN et al, 2001; SANTORELLI et al, 1997]. O complexo II parece ser o menos acometido em pacientes com MELAS, possivelmente por ser codificado pelo DNAn [CIAFALONI et al, 1992; HIRANO et al, 1992]. A dosagem bioquímica dos complexos da cadeia respiratória pode estar normal em alguns casos.

2.6.6 Alterações morfológicas

Inicialmente a biópsia muscular pode demonstrar apenas fibras musculares com acúmulo de mitocôndrias subsarcolemais sem formar as típicas RRF, porém praticamente todos os pacientes com MELAS apresentam RRF no decorrer da evolução, sendo que sua freqüência costuma ser maior na reação histoquímica para SDH do que na coloração pelo TGM, semelhante ao que ocorre em outras doenças mitocondriais [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992]. O grau de heteroplasmia (proporção de DNAm normal e mutante em cada tecido) também é um fator importante

influenciando a variabilidade dos achados da biópsia muscular [TOKUNAGA, 1993; TOKUNAGA, 1994].

Entretanto, as duas alterações morfológicas na biópsia muscular que ajudam a distinguir MELAS das demais doenças mitocondriais são: a grande proporção de RRF que tem atividade normal da COX e a presença de vasos com reação aumentada para SDH [HIRANO & PAVLAKIS, 1994; TANJI et al, 2008; ROSSMANITH et al, 2008]. A análise quantitativa mostra que 80 a 90% das fibras musculares têm maior quantidade de DNAm_t (normal e mutante), sendo que a proporção de DNAm_t mutante é extremamente elevada em RRF quando comparadas com as demais fibras que não formam RRF [TOKUNAGA et al, 1993; TOKUNAGA et al, 1994]. Contudo, como mencionado anteriormente, a presença de fibras COX- nos pacientes com MELAS é menor do que a encontrada por outras doenças mitocondriais, como MERRF ou OEPC [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992]. Alguns autores referem que a atividade da COX nas fibras musculares é variável, ou seja, a presença de áreas COX- ocorre de forma segmentar ao longo de uma mesma fibra muscular em pacientes com MELAS, semelhante ao que ocorre em outras doenças mitocondriais, como a OEPC, sugerindo que a alteração do complexo IV não é a principal alteração nesse grupo de pacientes [GOTO, 1995; MATSUOKA et al, 1992; PETRUZZELLA et al, 1994, TANJI et al, 2008]. Dessa forma, podem ocorrer numa mesma fibra muscular porções COX positivas e COX negativas com limites bem demarcados [MATSUOKA et al, 1992; MORAES et al, 1992; PETRUZZELLA et al, 1994]. Os estudos dessas fibras musculares mostraram que possivelmente a proporção de DNAm_t normal e mutante nessas regiões influenciaria a deficiência funcional do complexo IV, mesmo em pacientes com mutações

sem envolvimento dos genes codificadores das subunidades COX, como por exemplo, os com a mutação A3243G [MORAES et al, 1992; PETRUZZELLA et al, 1994; SCIACCO et al, 1994].

A presença de vasos na biópsia muscular, usualmente arteríolas, com reação aumentada para SDH (SDH+) é um achado freqüente em pacientes com MELAS ou MERRF, mas raramente encontrado em pacientes com OEPC [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992; HASEGAWA et al, 1991]. Esses vasos podem ocorrer também em outros tecidos como cérebro e trato gastrointestinal [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992; HASEGAWA et al, 1991]. Na microscopia eletrônica foi observado que esses vasos contem mitocôndrias aumentadas em número e tamanho, semelhante ao que ocorre no sistema nervoso central, sendo compatível com doença mitocondrial [GILCHRIST et al, 1996; HASEGAWA et al, 1991]. Da mesma forma com que ocorre nas RRF, o estudo desses vasos com reação aumentada para SDH mostra que a proporção de DNAm_t mutante é extremamente elevada nesses vasos quando comparadas com os vasos com reação normal para SDH [TOKUNAGA, 1993; TOKUNAGA, 1994]. Esse tipo de envolvimento vascular em pacientes com MELAS ainda não tem seu significado patogênico totalmente conhecido, contudo, alguns investigadores ainda acreditam que essa alteração dos vasos sanguíneos indica que MELAS é uma angiopatia sistêmica [HIRANO & PAVLAKIS, 1994; TOKUNAGA, 1993; TOKUNAGA, 1994].

A principal importância dessa alteração, para alguns autores, está no fato de que na ausência de RRF na biópsia muscular de pacientes com suspeita de MELAS o diagnóstico histológico pode ser realizado com base na reação aumentada desses vasos na SDH [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992].

Dessa forma, a biópsia muscular de pacientes com MELAS, especialmente aqueles com a mutação A3243G, costuma ter vasos com reação aumentada para SDH e RRF com atividade normal para COX [PETRUZZELLA et al, 1994; TOKUNAGA, 1993; TOKUNAGA, 1994].

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é conhecer as características da síndrome de MELAS, apresentadas por pacientes acompanhados pelo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, para:

- 3.1 Caracterizar as manifestações clínicas, laboratoriais, bioquímicas, eletrofisiológicas e morfológicas;
- 3.2 Determinar as mutações do gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm^t; e
- 3.3 Verificar a utilidade da biópsia muscular como método diagnóstico da síndrome de MELAS quando comparada ao estudo molecular do gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm^t.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro de 1978 até janeiro de 2008, foram realizadas 4400 biópsias musculares para investigação diagnóstica de diversas doenças no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

A análise retrospectiva do banco de dados encontrou os pacientes com diagnóstico de MELAS, de acordo com os seguintes critérios diagnósticos obrigatórios para inclusão dos pacientes no estudo [CIAFALONI et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994; PAVLAKIS et al, 1984]: (1) encefalopatia caracterizada por pelo menos uma das seguintes manifestações clínicas: crises convulsivas, demência ou déficit cognitivo, cefaléia ou vômitos recorrentes; (2) episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (com tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética evidenciando alteração cerebral focal); e (3) evidência bioquímica de disfunção mitocondrial, como acidose láctica ou fibras vermelhas rasgadas na biópsia muscular, ou ainda por ambas.

Do total dos pacientes analisados, a suspeita diagnóstica de MELAS foi feita em 14 pacientes por estes critérios, mas três pacientes foram excluídos deste estudo por apresentarem falta de evidência bioquímica ou morfológica de disfunção mitocondrial e dois pela idade avançada quando apresentaram o episódio semelhante a acidente vascular cerebral.

Nos nove pacientes que possuíam todos os critérios de inclusão foram pesquisados os dados relacionados com: avaliação clínica, exame laboratorial, exame de eletroneuromiografia, eletrocardiograma, estudo

neuroradiológico, bioquímica muscular, biópsia muscular e estudo molecular do DNAm.

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os dados clínicos como idade, sexo, manifestações clínicas e história familiar foram coletados com base no prontuário médico de cada paciente durante seu internamento para realizar biópsia muscular. O tempo de progressão da doença foi considerado como o intervalo entre o episódio sugestivo de AVC e o diagnóstico pela alteração histoquímica da biópsia muscular sendo obtido pelo prontuário médico de cada paciente durante seu acompanhamento ambulatorial ou internamento para investigação diagnóstica.

4.2 EXAME LABORATORIAL

Os níveis séricos das enzimas musculares CK e aldolase (AL) foram descritos refletindo o número de vezes em que a enzima está elevada acima do normal¹ [WERNECK, 1991]. Da mesma forma, os níveis de ácido láctico sérico e do LCR mostram a proporção do seu aumento quando comparadas com níveis normais.

¹ O nível sérico foi dividido pelo valor superior da normalidade após subtração do valor normal

4.3 ELETROCARDIOGRAMA

As alterações eletrocardiográficas foram descritas conforme procedimento de rotina do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

4.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA

Os estudos de condução nervosa foram analisados conforme procedimentos de rotina do Serviço de Eletroneuromiografia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná [DUMITRO et al, 2002a; WERNECK, 1991; WERNECK & LIMA, 1988].

O exame de eletromiografia de agulha foi realizado com agulha concêntrica utilizando as técnicas previamente descritas na literatura [DUMITRO et al, 2002b], de uso rotineiro no Serviço de Eletroneuromiografia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná [WERNECK, 1991; WERNECK & LIMA, 1988], sendo classificado como: normal, miopático, desenergado ou misto (miopático e desenergado).

4.5 ESTUDO NEURORADIOLÓGICO

A localização da lesão sugestiva de AVC e a presença de calcificação de gânglios da base foram observadas a partir dos exames de tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética de crânio realizados pelos pacientes fora do episódio semelhante à AVC.

4.6 ESTUDO BIOQUÍMICO

A dosagem das enzimas mitocondriais (NADH-desidrogenase, NADH-citocromo c redutase, succinato desidrogenase, succinato-citocromo c redutase, citocromo c oxidase e citrato sintetase) foi realizada a partir de material proveniente de biópsia muscular estocada em nitrogênio líquido conforme rotina do laboratório de histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas e do laboratório de oxidações biológicas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná [PEDROSO, 1995]; ou do laboratório de bioquímica muscular da Universidade de Columbia em New York (cortesia do Prof SALVATORE DIMAURO). Os valores de referência correspondem à atividade enzimática média em indivíduos normais da mesma faixa etária (controles) com desvio padrão.

4.7 BIÓPSIA MUSCULAR

Os fragmentos musculares provenientes de biópsia do músculo bíceps braquial ou vasto lateral foram congelados em nitrogênio líquido e submetidos a cortes seriados de oito a dez micra de espessura realizados no criostato a -25°C . As técnicas rotineiras de coloração e histoquímica descritas na literatura [DUBOWITZ, 1985] utilizadas no Laboratório de Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná [WERNECK, 1981] foram: (1) colorações: hematoxilina e eosina (HE), tricromo de Gomori modificado

(TGM), oil red O, ácido periódico de Shiff (PAS), cresil violeta e sirius red; e (2) reações histoquímicas: adenosinatrifosfatase (ATPase) pré-incubada em diferentes pHs (9,4; 4,6 e 4,3), desidrogenase tetrazolium redutase (NADH), esterase, miofosforilase, fosfatase acida, fosfatase alcalina, desidrogenase succínica (SDH), citocromo c oxidase (COX) e adenilato deaminase.

A análise morfológica e histoquímica do material foram feitas em microscópio óptico marca Olympus, modelo BH2. As alterações relacionadas com disfunção mitocondrial foram analisadas qualitativamente buscando pela presença de: (1) “ragged red fibers” na coloração pelo TGM, denominadas de fibras vermelhas rasgadas (RRF); (2) fibras fortemente coradas na reação para SDH, denominadas de fibras granulares (SDH+); e (3) fibras não coradas pela reação da COX, denominadas de fibras COX negativas (COX-). A fibra muscular alterada em uma dessas três colorações foi analisada nas outras duas, para se estabelecer a correspondência entre a alteração morfológica e histoquímica, bem como, as fibras não coradas pela COX foram comparadas com a reação para ATPases para diferenciar sua deficiência com a dificuldade de coloração das fibras do tipo 2B por esta reação. Também, na análise qualitativa da biópsia muscular foram procuradas alterações relacionadas com proliferação mitocondrial em vasos (arteríolas intramusculares) sendo classificadas conforme reação para SDH em: (1) coloração normal; e (2) coloração forte (SDH+).

A análise morfológica quantitativa foi realizada pela contagem de aproximadamente 500 a 1000 fibras musculares de cada espécime, em campos diferentes, com objetiva de pequeno aumento (10X), a fim de determinar a freqüência de fibras com acúmulo de mitocôndrias formando

RRF nas colorações pelo TGM e SDH, e com deficiência de COX (COX-). Da mesma forma, a análise morfológica quantitativa dos vasos foi realizada pela contagem de todos os vasos presentes em cada espécime, comparando as colorações pelo HE, TGM e SDH com objetiva de pequeno aumento (10X), a fim de determinar a frequência de vasos normais e SDH+.

A descrição detalhada das soluções utilizadas no preparo da coloração pelo TGM; das reações histoquímicas pela SDH e pela COX pode ser encontrada na lista das técnicas rotineiras de coloração e histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Apêndice).

4.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL

A análise molecular em detalhes do DNAm^t foi realizada a partir de músculo por uma combinação de técnicas para a pesquisa das mutações descritas na literatura como freqüentes, bem como, para novas mutações no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm^t em pacientes com MELAS.

A descrição detalhada das fórmulas e do preparo do material utilizado nas reações foi listada conforme a rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Apêndice).

4.8.1 Extração do DNAm^t de amostras de músculo

A extração de DNA de músculo foi realizada com base na técnica por Fenol – Clorofórmio [SAMBROOK et al, 1989], com modificações em algumas etapas conforme descrito a seguir: O fragmento de músculo congelado foi adicionado com 0,5 ml de Solução Lise de Eritrócitos 10X (SLE 10X), amassando o fragmento do músculo com pestel para homogeneização, sendo centrifugado a 10000 rpm durante 5 minutos com posterior descarte do sobrenadante. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes. Ao precipitado adicionou-se 0,1 ml de proteinase K (5mg/ml), 0,15 ml de água miliq e 0,1 ml de sódio dodecil sulfato 10% (SDS). Após misturar por inversão, os tubos foram incubados em banho-maria de 55 °C por 16 horas no mínimo. Decorrido o tempo, a fase aquosa (superior) foi retirada sendo adicionada com 0,2 ml de fenol saturado (pH 7,6), 0,2 ml de clorofórmio e 0,1 ml de álcool isoamílico. Novamente as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (10000 rpm por 10 minutos). A fase aquosa foi retirada para ser adicionada com 0,5 ml de SEVAG. Após homogeneização as amostras foram centrifugadas (10000 rpm por 10 minutos). O sobrenadante foi despejado sobre 0,5 ml de etanol absoluto gelado e 0,05 ml de acetato de sódio 3M sendo os tubos invertidos por várias vezes até precipitar o DNA. Os tubos foram armazenados em baixa temperatura (-20 °C). Após 60 minutos, os tubos foram centrifugados (10000 rpm por 15 minutos) e desprezou-se o sobrenadante. Ao precipitado adicionou-se 0,3 ml de etanol 70% gelado, seguidos por homogeneização e centrifugação (10000 rpm por 5 minutos), sendo o sobrenadante desprezado. Após secar o DNA, adicionou-se de 0,05

de Solução de Tris-EDTA (TE) permanecendo em estufa de 37 °C por 12 horas no mínimo. No final, foram adicionados 0,05 ml de TE no precipitado de DNA para estocagem a -20 °C.

A técnica de extração de DNAm_t de músculo por Fenol – Clorofórmio [SAMBROOK, 1989] modificada, mostrou-se adequada para essa amostra, com as quantidades de DNA total obtidas descritas na tabela 10 (Apêndice).

4.8.2 Identificação das mutações no DNAm_t

A pesquisa das mutações de ponto A3243G e T3271C do DNAm_t foram realizadas por PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição), enquanto, na ausência dessas mutações foi realizado o seqüenciamento para pesquisa de outras mutações no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t.

Estudo molecular da mutação na posição 3243 do DNAm_t

Na pesquisa da mutação 3243 (troca da base adenina pela guanina no nucleotídeo 3243 no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t), a amplificação por PCR do fragmento que contém a mutação utilizou para uma solução final de 25 ul: 50pmol do oligonucleotídeo 3243-S (nt 3116-3134: 5' - CCTCCCTGTACGAAAGGAC - 3'), 50pmol do oligonucleotídeo 3243-AS (nt 3353-3333: 5' - GCGATTAGAATGGGTACAATG - 3'), 200 uM de cada dNTP (A,T,C,G), 2,5 uL de solução tampão 1X (500 mM KCl + 200 mM Tris-HCl pH 8,4), 2,0 mM de MgCl₂ e 2,5 ui de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A

amplificação foi realizada em 30 ciclos de desnaturação (94 °C por um minuto), anelamento (55 °C por um minuto) e extensão (72 °C por um minuto) no termociclador *MJ research PTC model* (MJ research, inc. Watertown, MA, USA). O fragmento amplificado de 238 pares de bases foi digerido com a enzima de restrição *HaeIII* (Jena Bioscience): 20 µl do produto do PCR foram digeridos com 1,5 µl da enzima em um volume final de 35 µl a 37 °C por 6 horas. O produto do PCR/RFLP foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida não denaturado a 12% (200V por 02 horas) e as bandas foram coradas com prata conforme técnica de rotina do laboratório [CUNHA et al, 2006]. Além dos dois sítios de clivagem da enzima presentes em normais, a mutação cria um terceiro sítio de clivagem pela troca de A por G na posição 3243. Dessa forma, a digestão do produto de PCR com essa enzima de restrição forneceu três fragmentos (169, 37 e 32 pb) no DNAm_t normal, enquanto que no paciente com mutação, um dos fragmentos (169 pb) é dividido em dois (97 e 72 pb), resultando em cinco fragmentos (169, 97, 72, 37 e 32 pb).

Estudo molecular da mutação na posição 3271 do DNAm_t

Na pesquisa da mutação 3271 (substituição da base timina pela citosina no nucleotídeo 3271 no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t), a amplificação do fragmento foi realizada para uma solução final de 25 µl com: 50pmol do oligonucleotídeos 3271-S (nt 3148-3169: 5' – CCTACTTCACAAAGCGCCTTCC – 3'), 50pmol do oligonucleotídeo 3271-AS (nt 3295-3272): 5' – GAGGAATTGAACCTCTGACTCTAA – 3'), 200 µM de

cada dNTP (A,T,C,G), 2,5 uL de solução tampão 1X (500 mM KCl + 200 mM Tris-HCl pH 8,4), 2,0 mM de MgCl₂ e 2,5 ui de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada em 30 ciclos de desnaturação (94 °C por um minuto), anelamento (55 °C por um minuto) e extensão (72 °C por um minuto), no termociclador *MJ research PTC model* (MJ research, inc. Watertown, MA, USA). O fragmento amplificado de 148 pb será digerido com a enzima de restrição Ddel (Invitrogen): 20 µl do produto do PCR será digerido com 1,5 µl da enzima em um volume final de 35 µl a 37 °C por 6 horas. O produto do PCR/RFLP será submetido a eletroforese em gel de poli-acrilamida não denaturado a 12% (200V por 02 horas) e as bandas foram coradas com prata conforme técnica de rotina do laboratório [CUNHA et al, 2006]. Existe um único sítio de clivagem da enzima no DNAm_t normal, mas a mutação cria um segundo sítio de clivagem no DNAm_t com a mutação pela troca de T pela C na posição 3271. Dessa forma, a digestão do produto de PCR com essa enzima de restrição forneceu dois fragmentos (103 e 45 pb) no DNAm_t normal, enquanto que no paciente com mutação, um dos fragmentos (103 pb) é dividido em dois (79 e 24 pb), resultando em quatro fragmentos (103, 79, 45 e 24 pb).

Seqüenciamento do gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t

Na pesquisa de mutações através do seqüenciamento, foi realizado PCR com a amplificação do fragmento localizado entre os nucleotídeos 3230 e 3304, que contém o gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t, utilizando para uma solução final de 25 ul: 50pmol do oligonucleotídeo 3243-S (nt 3116-3134: 5' -

CCTCCCTGTACGAAAGGAC - 3'), 50pmol do oligonucleotídeo 3243-AS (nt 3353-3333: 5' - GCGATTAGAATGGGTACAATG - 3'), 200 uM de cada dNTP (A,T,C,G), 2,5 uL de solução tampão 1X (500 mM KCl + 200 mM Tris-HCl pH 8,4), 2,0 mM de MgCl₂ e 2,5 ui de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada em 30 ciclos de desnaturação (94 °C por um minuto), anelamento (55 °C por um minuto) e extensão (72 °C por um minuto), no termociclador *MJ research PTC model* (MJ research, inc. Watertown, MA, USA). O produto dessa amplificação (10ul) foi purificado pela adição de 2ul da enzima ExoSAP-IT (Atria Genetics) e um ciclo de 37 °C por 15 minutos e 80 °C por 15 minutos. A solução de seqüenciamento para volume final de 10ul foi realizado com: 2ul da solução Big Dye Mix (Applied Biosystems), 1ul da solução tampão 1X, 06pmol/ul do oligonucleotídeo 3243-S, e 02ul do produto da PCR. A solução foi submetida a 35 ciclos de desnaturação (96 °C por 15 segundos), anelamento (50 °C por 15 segundos) e extensão (60 °C por quatro minutos). Esse produto foi purificado com 40ul de solução de isopropanol 65%, com posterior centrifugacao (2000g por 30 minutos) seguida de centrifugação invertida (200g por 15 segundos) para remover o isopropanol, e adicionado 200ul de etanol 60%, com posterior centrifugação (2000g por 5 minutos) seguida de centrifugação invertida (200g por 15 segundos) para remover o etanol. O material foi secado em "banho seco", seguido por suspensão com 15ul de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), sendo submetido a desnaturação (95 °C por 3 minutos). O produto dessa reação foi submetido a uma corrida eletroforética, com capilar de 36 cm e polímero POP 06 (Applied Biosystems), no sequenciador *ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyser* (Hitachi High Technologies Corporation

– Tokio/Japão), sendo usado protocolo de corrida adequado para as soluções utilizadas.

As seqüências obtidas foram comparadas a seqüência do DNAm normal na pesquisa das mutações previamente descritas como associadas ao fenótipo de MELAS, bem como, para pesquisa de possíveis mutações novas desse gene [ANDERSON et al, 1981].

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A amostra consiste de 9 pacientes, sendo 4 do sexo feminino e 5 do masculino, com idade entre 3 e 25 anos, mostrando predomínio de pacientes jovens nessa série, uma vez que em 7 pacientes o início foi antes do 15 anos de idade. O desenvolvimento motor foi normal em 8 pacientes. O tempo de progressão da doença variou de um até 90 meses, com tempo médio de 27 meses. Nenhum paciente apresentou história familiar com mesma manifestação clínica.

As principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes foram: episódios semelhantes a acidente vascular cerebral isquêmico (100%), vômitos (100%), cefaléia (77,7%), crises convulsivas (66,6%), fraqueza muscular (55,5%), demência (44,4%), surdez (22,2%), ptose palpebral (22,2%), oftalmoparesia (22,2%), baixa estatura (11,1%), ataxia (11,1%) e neuropatia facial (11,1%).

A tabela 3 descreve os dados epidemiológicos e achados clínicos de todos os pacientes com MELAS.

Tabela 3. Descrição clínica dos pacientes com MELAS.

Manifestação Clínica	Caso								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Idade *	12	22	9	3	4	15	14	8	25
Sexo	M	F	M	M	F	F	M	M	F
Tempo de evolução **	36	6	90	12	10	1	48	12	33
História familiar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atraso desenvolvimento	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Episódio ~AVC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vômitos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cefaléia	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Crises convulsivas	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Fraqueza	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Demência	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Surdez	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Ptose palpebral	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Oftalmoparesia	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Baixa estatura	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ataxia	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Neuropatia facial	-	-	-	-	+	-	-	-	-

*: anos; **: meses entre o episódio ~AVC e o diagnóstico de MELAS; F: feminino; M: masculino; +: presente; -: ausente; ~AVC: episódio semelhante a acidente vascular cerebral isquêmico.

5.2 EXAME LABORATORIAL

A dosagem sérica da CK foi realizada em 7 pacientes e da AL em 5 pacientes (Tabela 4). O nível sérico da CK estava elevado até uma vez o valor da normalidade em apenas um paciente (14,3%) sendo normal nos demais (85,7%). O nível sérico da AL foi normal em todos os pacientes estudados (100%).

A dosagem sérica do ácido láctico foi realizada em 8 pacientes e no LCR em 2 pacientes (Tabela 4). O nível de ácido láctico sérico estava elevado de uma até três vezes o valor da normalidade em 6 pacientes estudados (75%) sendo normal nos dois restantes (25%). O nível de ácido láctico do LCR estava aumentado em uma vez o valor da normalidade em um paciente (50%) e foi normal em outro paciente (50%).

Tabela 4. Alterações laboratoriais dos pacientes com MELAS.

Caso	Enzimas musculares *		Ácido láctico *	
	CK	AL	Sérico	LCR
1	N	N	3	NR
2	NR	NR	NR	NR
3	N	NR	N	NR
4	N	NR	1	NR
5	N	N	1	NR
6	N	N	1	NR
7	1	N	3	1
8	N	N	1	N
9	NR	NR	N	NR

*: proporção do seu aumento quando comparado com nível normal; CK: creatinoquinase; AL: aldolase; LCR: líquido cefalorraquiano; N: normal; NR: não realizado.

5.3 ELETROCARDIOGRAMA

As alterações eletrocardiográficas, observadas em 6 pacientes, mostraram síndrome de Wolf-Parkinson-White no caso 6, hipertrofia ventricular esquerda com anormalidade não específica da onda T no caso 7 e foi normal nos restantes 4 pacientes (casos 1, 2, 3 e 8).

A tabela 5 descreve os achados eletrocardiográficos dos pacientes com MELAS.

5.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA

O padrão da eletromiografia de agulha, observado em 4 pacientes, foi miopática no caso 7, desenergizada apenas na musculatura facial no caso 5 e normal nos restantes 2 pacientes (casos 3 e 8). O estudo de condução nervosa mostrou neuropatia motora axonal do nervo facial no caso 5 sendo normal no restante dos pacientes (casos 3, 7 e 8).

A tabela 5 descreve os achados da eletroneuromiografia (eletromiografia de agulha e estudo da condução nervosa) dos pacientes com MELAS.

Tabela 5. Achados eletrofisiológicos dos pacientes com MELAS.

Caso	ECG	EMG	ECN
1	N	NR	NR
2	N	NR	NR
3	N	N	N
4	NR	NR	NR
5	NR	D*	NF*
6	WPW	NR	NR
7	HVE + ARV	PM	N
8	N	N	N
9	NR	NR	NR

ECG: eletrocardiograma; EMG: eletromiografia de agulha; ECN: estudo da condução nervosa; N: normal; NR: não realizada; WPW: síndrome de Wolf-Parkinson-White; HVE: hipertrofia ventricular esquerda; ARV: alteração da repolarização ventricular; D*: desenervação em músculos da face; PM: padrão miopático; NF*: neuropatia axonal do nervo facial.

5.5 ESTUDO NEURORADIOLÓGICO

O estudo radiológico encefálico foi feito por tomografia computadorizada em 4 pacientes (casos 1, 2, 4 e 6) e por ressonância nuclear magnética em 5 pacientes (casos 3, 5, 7, 8 e 9) mostrando padrão semelhante ao de lesão isquêmica em todos os pacientes (Tabela 6). A localização da lesão foi unilateral em 66,6% dos pacientes (casos 2, 4, 6, 7 e 9) e bilateral em 44,4% (casos 1, 3, 5 e 8). As localizações das lesões foram: gânglios da base, occipital, cerebelar, frontal-temporal, temporal-occipital, frontal-parietal-temporal e temporal-parietal-occipital (Tabela 6). A presença de calcificação de gânglios da base foi observada apenas no caso 1 (Tabela 6).

A figura 6 ilustra o padrão radiológico com lesão unilateral no caso 7 (A) e bilateral no caso 8 (B).

Tabela 6. Achados neuroradiológicos dos pacientes com MELAS.

Caso	Tipo	Lado	Localização da lesão	Calcificação dos GB
1	TC	D / E	temporal / occipital	+
2	TC	D	frontal / temporal	-
3	RM	D / E	gânglios da base	-
4	TC	E	temporal / occipital	-
5	RM	D / E	occipital	-
6	TC	E	temporal / parietal / occipital	-
7	RM	E	temporal / parietal / occipital	-
8	RM	D / E	frontal / parietal / temporal	-
9	RM	D	cerebelo	-

GB: gânglios da base; TC: imagem por tomografia computadorizada; RM: imagem por ressonância magnética; D: direito; E: esquerdo; +: presente; -: ausente.

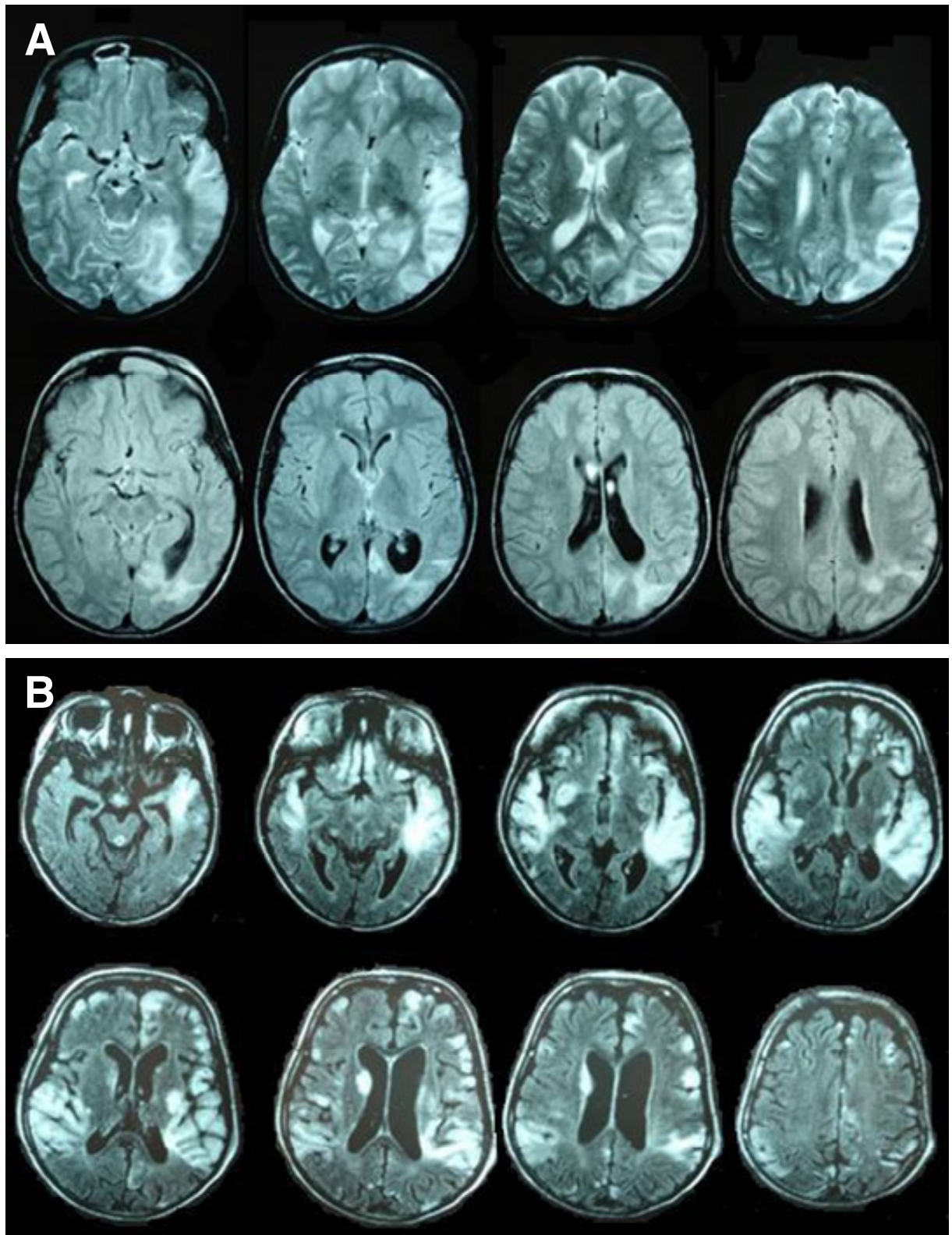


Figura 6: Lesões semelhantes à AVC pela ressonância nuclear magnética de crânio mostrando: (A) padrão radiológico unilateral no caso 7 nas imagens ponderadas em T2 e FLAIR; e (B) padrão bilateral no caso 8 nas imagens ponderadas em FLAIR.

5.6 ESTUDO BIOQUÍMICO

A dosagem muscular das enzimas mitocondriais foi possível em 4 pacientes (Tabela 7).

Os casos 1 e 2 mostraram diminuição somente da enzima COX caracterizando um provável defeito no complexo IV da cadeia respiratória.

Os casos 4 e 5 mostraram diminuição das enzimas NADH-desidrogenase, NADH-citocromo c redutase e succinato-citocromo c redutase. O caso 5 mostrou atividade diminuída da enzima succinato desidrogenase. Esse perfil bioquímico sugere que nos casos 4 e 5 existe deficiência combinada da cadeia respiratória dos complexos I e II, com indícios de possível anormalidade no complexo III. A afirmação é fundamentada pela medida da atividade da enzima NADH-citocromo c redutase (complexos I + III) ter revelado maior grau de decréscimo na atividade em comparação com o decréscimo apresentado pela NADH desidrogenase (mede parte do complexo I). A caracterização da disfunção ao nível do complexo II ficou prejudicada no caso 4 pelo fato da enzima succinato desidrogenase (parte do complexo II) não ter sido determinada, por falta de proteína mitocondrial.

Os níveis da citrato sintetase foram normais em todos os casos estudados, mostrando normalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

Tabela 7. Dosagem enzimática dos pacientes com MELAS.

Enzima (nmoles/min/mg)	Caso			
	1	2	4	5
NADH-desidrogenase	32,25 VR: 35,48±7,07	35,48 VR: 35,48±7,07	1257,27 VR: 2416,46±336,39	992,65 VR: 2416,46±336,39
NADH-citocromo c redutase	0,804 VR: 1,02±0,377	0,70 VR: 1,02±0,377	32,03 VR: 115,12±24,72	32,20 VR: 115,12±24,72
Succinato desidrogenase	0,942 VR: 1,00±0,526	1,20 VR: 1,00±0,526	*	22,52 VR: 110,13±20,55
Succinato-citocromo c redutase	0,562 VR: 0,701±0,228	0,74 VR: 0,701±0,228	12,50 VR: 90,64±13,19	15,09 VR: 90,64±13,19
Citocromo c oxidase	1,21 VR: 2,80±0,52	0,89 VR: 2,80±0,52	141,66 VR: 118,35±45,96	123,79 VR: 118,35±45,96
Citrato sintetase	12,25 VR: 9,88±2,55	17,50 VR: 9,88±2,55	82,11 VR: 98,94±27,28	87,85 VR: 98,94±27,28

VR: valor de referência correspondente à atividade enzimática média em indivíduos normais com desvio padrão; *: atividade enzimática não determinada.

5.7 BIÓPSIA MUSCULAR

A coloração pelo TGM e a reação histoquímica para SDH foram realizadas em todos os pacientes, mas somente em 7 casos foi possível realizar a reação histoquímica para COX.

A presença de fibras musculares com acúmulo de mitocôndrias, formando RRF, esteve presente em todos os pacientes, mas sua frequência variou de 0,4% até 10% na coloração pelo TGM e de 0,7% até 11,8% na reação histoquímica para SDH. Frequência de fibras com acúmulo de

mitocôndrias formando RRF acima de 2% foi encontrada em 55,5% dos pacientes com a coloração pelo TGM e em 88,8% dos pacientes na reação histoquímica para SDH. A reação histoquímica mostrou que a atividade da COX apresentava deficiência apenas no caso 9, no qual foi encontrado 32,7% de fibras COX-.

A presença de vaso SDH+ foi encontrada apenas em 5 casos (55,5%). A frequência dos vasos SDH+ na biópsia muscular variou de 33,3% a 75% nesses pacientes (Tabela 8).

A tabela 8 descreve os achados morfológicos da biópsia muscular na coloração pelo TGM e na reação histoquímica para SDH e COX dos pacientes com MELAS.

As figuras 7 e 8 mostram a presença de RRF na coloração pelo TGM (A) e reação histoquímica para SDH (B) nos casos 1 e 7.

A figura 9 compara as fibras musculares com atividade normal para COX (caso 7) das COX- (Caso 9).

A figura 10 mostra a reação aumentada dos vasos SDH+ comparado com reação normal.

Tabela 8. Características das fibras musculares e vasos na biópsia muscular dos pacientes com MELAS.

Caso	RRF (%)		COX- (%)	Vaso SDH+ (%) (vaso SDH+/normal)
	TGM	SDH+		
1	10,0	11,8	NR	33,3 (2/6)
2	0,5	2,1	NR	0 (0/11)
3	2,4	5,3	0	0 (0/10)
4	0	0,7	0	0 (0/7)
5	6,3	7,5	0	0 (0/14)
6	0,4	3,8	0	37,5 (3/8)
7	2,2	5,4	0	70 (14/20)
8	6,9	9,2	0	75 (6/8)
9	0,8	2,0	32,7	38 (8/21)

RRF: “ragged red fibers” ou fibras vermelhas rasgadas; TGM: coloração pelo tricromio de Gomori modificado; SDH+: coloração forte na reação para SDH nas fibras musculares ou vasos; COX-: fibras musculares não coradas pela reação da citocromo C oxidase; +: presente; -: ausente; NR: não realizado.

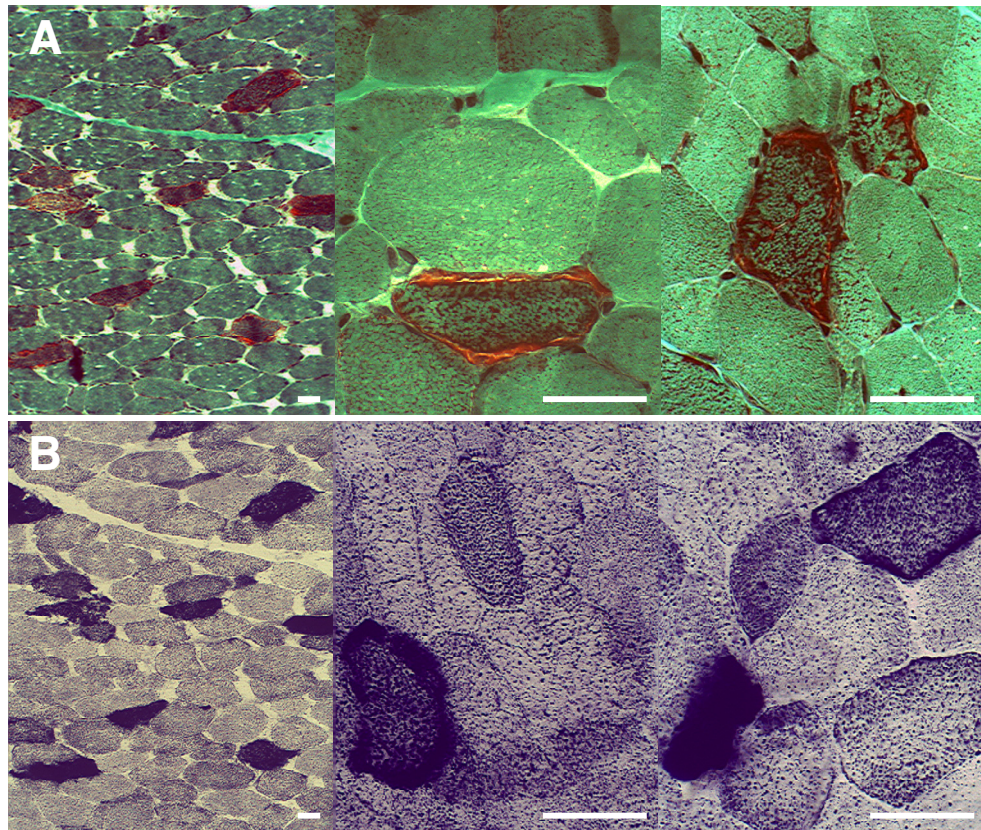


Figura 7: A presença de RRF na coloração pelo TGM (A) quando comparada à reação histoquímica para SDH (B) no caso 1. Barra = 50µm.

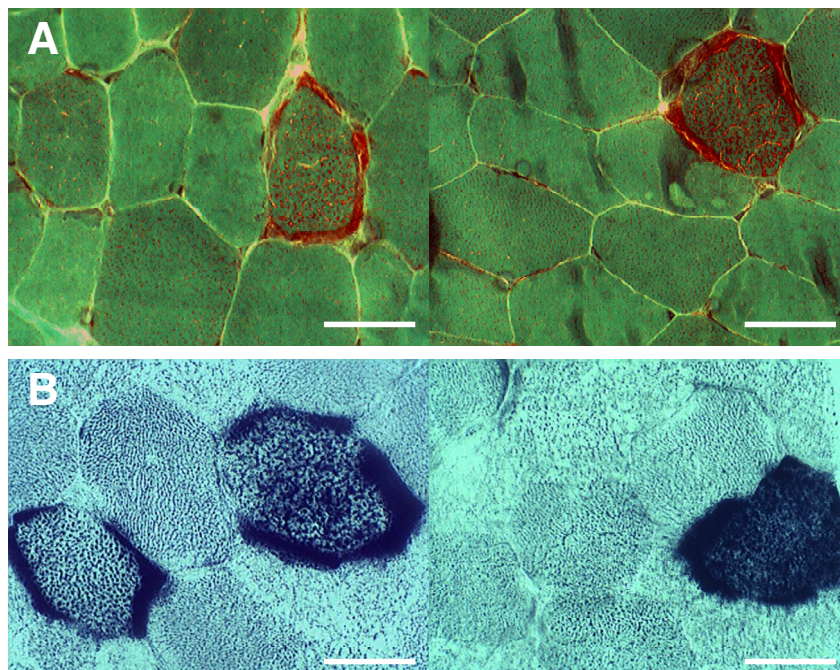


Figura 8: A presença de RRF na coloração pelo TGM (A) e pela reação histoquímica para SDH (B) no caso 7. Barra = 50µm.

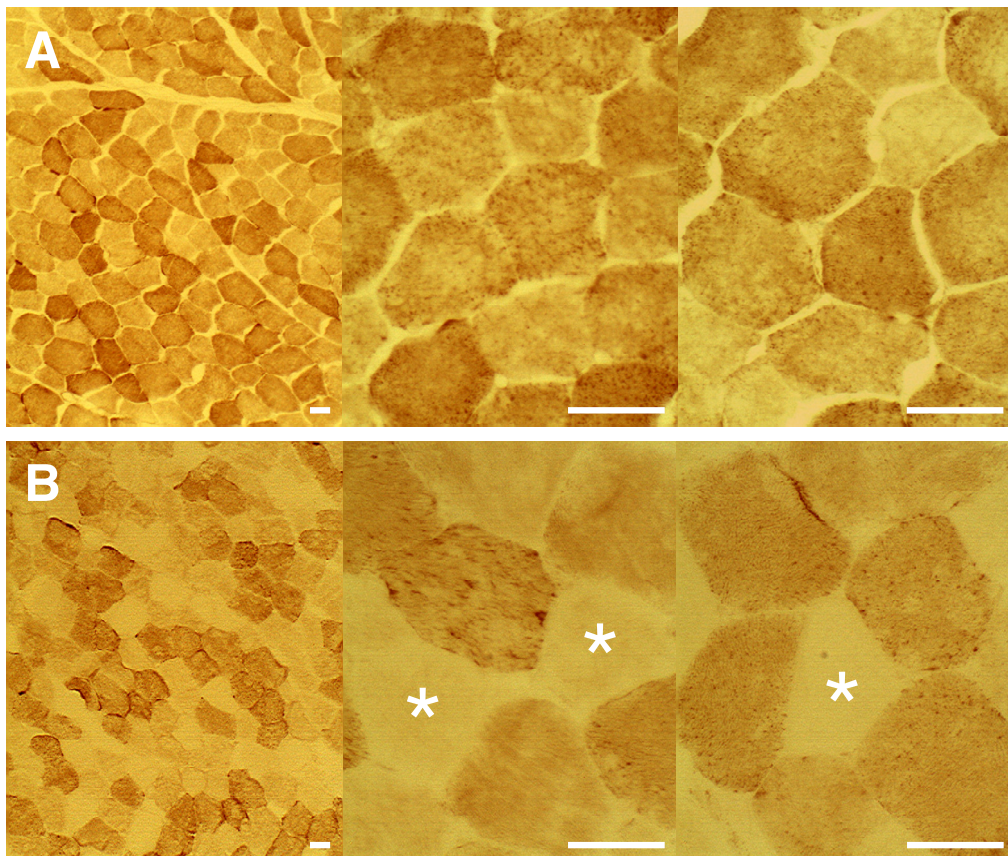


Figura 9: Atividade da COX de fibras musculares normais (A) quando comparadas a fibras deficientes (B). *: fibras COX-. (A: caso 7; B: caso 9). Barra = 50um.

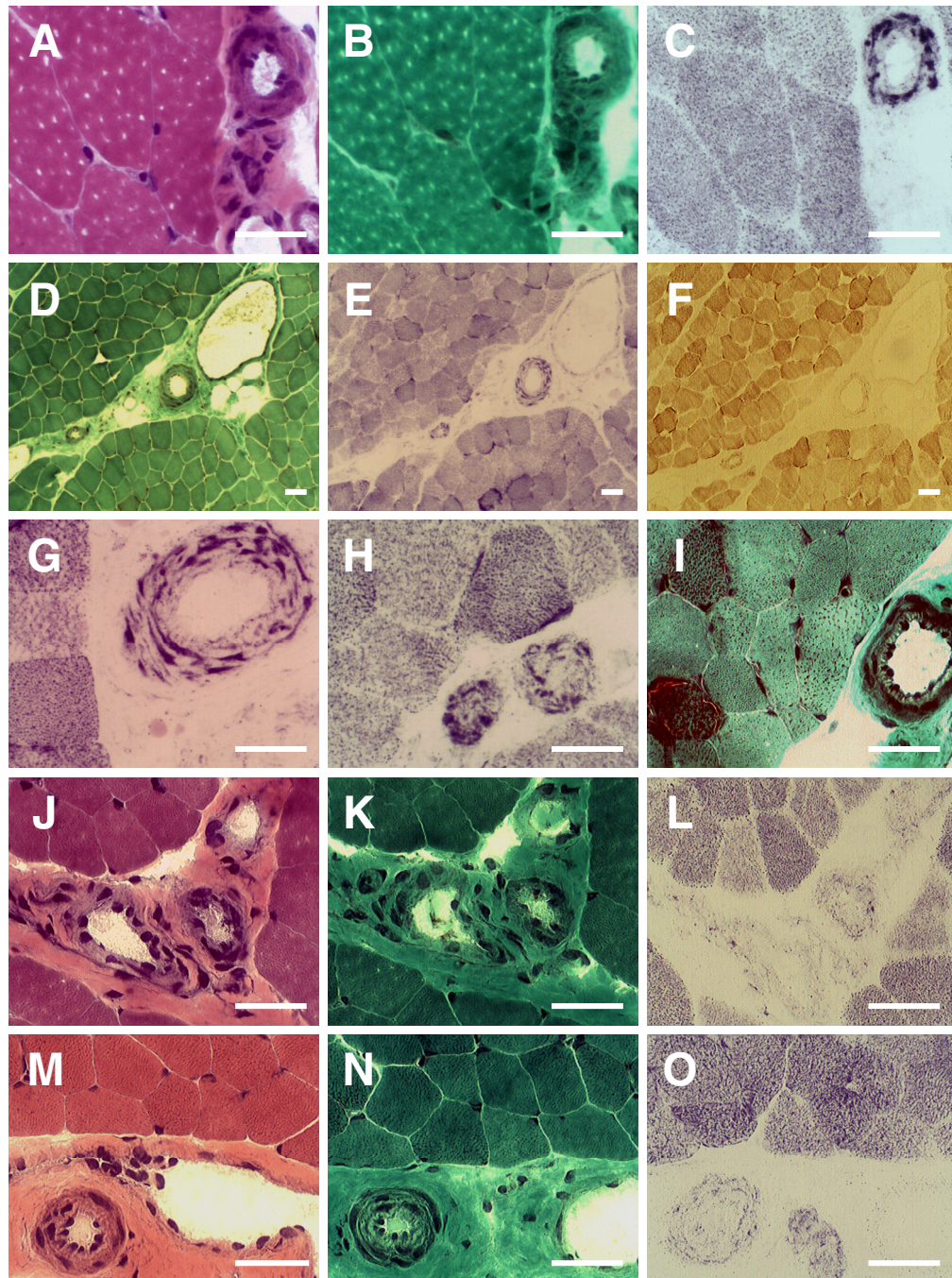


Figura 10: A presença de vasos com reação da SDH aumentada (C, E, G e H) ou normal (L e O); e o comportamento dos vasos nas colorações pelo HE, TGM e reação histoquímica para COX. (A, B e C: caso 6; D, E, F, G e H: caso 7; I: caso 1; J, K e L: caso 3; M, N e O: caso 5). Barra = 50um.

5.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL

A pesquisa de mutação do DNAMt foi possível somente em 6 pacientes (casos 1, 4, 6, 7, 8 e 9) pois os demais (casos 2, 3 e 5) não possuíam músculo estocado em nitrogênio líquido, no banco de biópsias do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, disponível para realizar o estudo molecular.

5.8.1 Identificação das mutações no DNAMt

A combinação das técnicas de PCR/RLFP e sequenciamento identificaram mutação no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAMt em metade dos pacientes estudados (casos 6, 7 e 8), como especificado na Tabela 9.

Estudo molecular da mutação na posição 3243 do DNAMt

A pesquisa da mutação ponto 3243 do DNAMt foi realizada em 6 pacientes por PCR/RLFP. A digestão do produto de PCR com enzima de restrição forneceu três fragmentos (169, 37 e 32 pb) no DNAMt de 3 pacientes (caso 1, 4 e 9) mostrando que esses pacientes não possuem mutação nesse ponto do seu DNAMt, enquanto que 3 pacientes (casos 6, 7 e 8) apresentaram cinco fragmentos (169, 97, 72, 37 e 32 pb) no DNAMt confirmando neles a presença de DNAMt mutante (Figura 11).

Estudo molecular da mutação na posição 3271 do DNAm^t

A pesquisa da mutação ponto 3271 do DNAm^t foi realizada em 3 pacientes (casos 1, 4 e 9) que não tinham a mutação ponto 3243. A digestão do produto de PCR com a enzima de restrição forneceu apenas dois fragmentos (103 e 45 pb) no DNAm^t desses pacientes mostrando que esses pacientes não possuem mutação nesse ponto do seu DNAm^t (Figura 12).

Sequenciamento do gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm^t

A pesquisa de outras mutações no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm^t foi realizada em 3 pacientes (casos 1, 4 e 9) que não tinham a mutação ponto 3243 ou 3271 do DNAm^t. O sequenciamento não mostrou presença de mutações conhecidas ou novas no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm^t (Figura 13).

Tabela 9. Resultado do estudo molecular dos pacientes com MELAS.

Técnica:	Caso					
Mutação do DNAm	1	4	6	7	8	9
PCR/RLFP:						
A3243G	-	-	+	+	+	-
T3271C	-	-	NR	NR	NR	-
Seqüenciamento:						
A3243G	-	-	NR	NR	NR	-
A3252G	-	-	NR	NR	NR	-
C3256T	-	-	NR	NR	NR	-
A3260G	-	-	NR	NR	NR	-
T3271C	-	-	NR	NR	NR	-
T3291C	-	-	NR	NR	NR	-
Novas mutações	-	-	NR	NR	NR	-

-: ausente; +: presente; NR: não realizado.

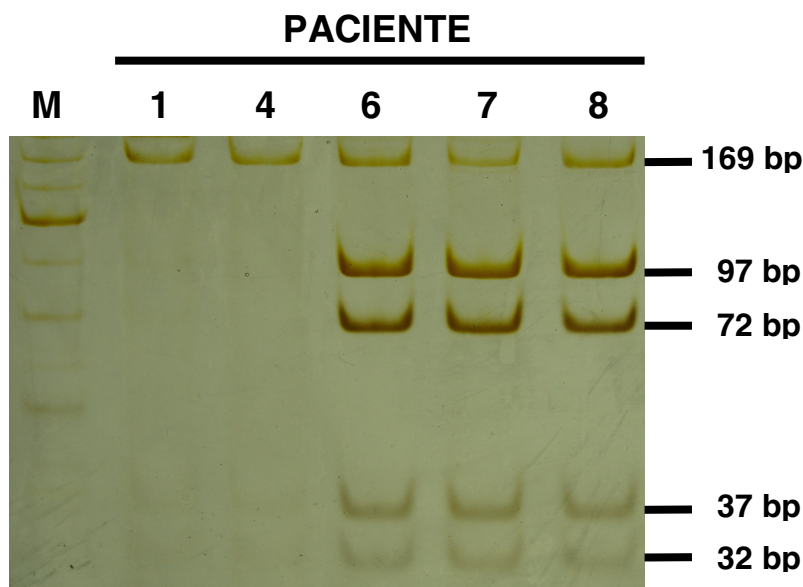


Figura 11: Na presença da mutação ponto A3243G os pacientes apresentaram cinco fragmentos (169, 97, 72, 37 e 32 pb) confirmando neles a presença de DNAMt mutante quando submetidos à PCR/RLFP comparados aos três fragmentos (169, 37 e 32 pb) de pacientes com DNAMt normal. M = marcador de peso molecular de 25pb.

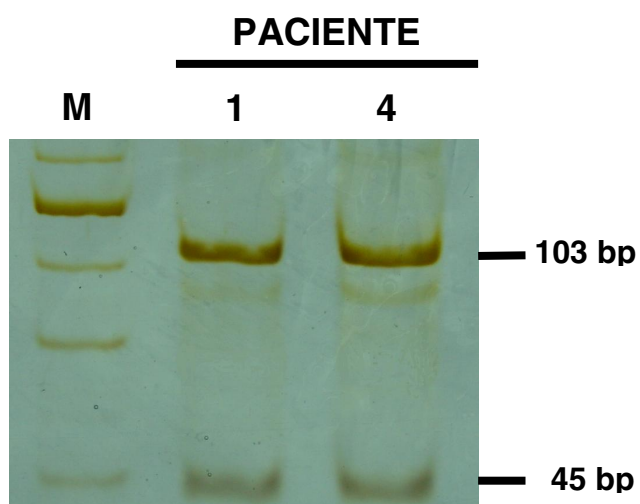


Figura 12: PCR/RLFP para pesquisa da mutação ponto T3271C com a presença de dois fragmentos (103 e 45 pb) no DNAMt mostrando que esses pacientes não possuem mutação nesse ponto do seu DNAMt. M = marcador de peso molecular de 25pb.

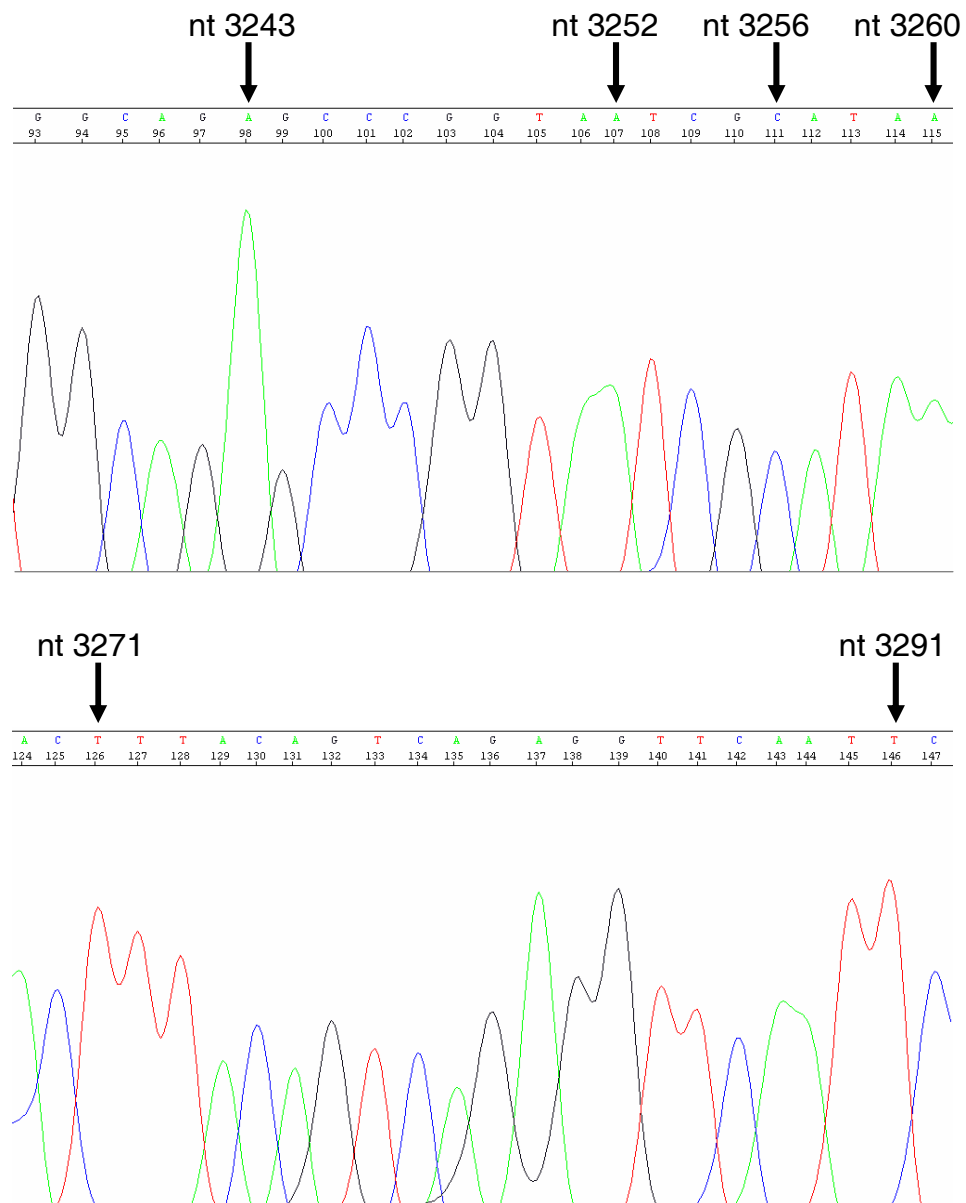


Figura 13: Seqüenciamento do gene tRNA^{Leu} (UUR) do DNAm^t do paciente 4 mostrando ausência de mutações conhecidas por causarem o fenótipo de MELAS (setas) ou novas mutações no DNAm^t.

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

As manifestações clínicas iniciam antes dos 40 anos de idade em até 90% dos pacientes com MELAS [FINSTERER, 2007; HIRANO et al, 1992]. O desenvolvimento psicomotor na infância costuma ser normal entre 86% a 97,5% dos pacientes com MELAS [CIAFALONI et al, 1992; GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. Isso também foi observado na nossa amostra, uma vez que em todos os pacientes o início das manifestações clínicas foram antes dos 40 anos de idade e o desenvolvimento psicomotor na infância foi normal em 8 pacientes.

Os sintomas clínicos têm alta variabilidade nos pacientes com doenças mitocondriais, mas como a presença de episódio semelhante à AVC, bem como, de encefalopatia são critérios diagnósticos de MELAS é esperado que todos os pacientes tenham essas manifestações clínicas. A presença de episódio semelhante à AVC antes dos 15 anos de idade varia entre 62% a 85%, semelhante aos 77,7% dos pacientes encontrados na nossa amostra [CIAFALONI et al, 1992; GOTO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. Crises convulsivas podem ocorrer de 85% até 96% dos pacientes com MELAS, sendo encontrada em 66,6% da nossa amostra [GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. A demência pode ocorrer de 65% até 90% dos casos, sendo que em nossa amostra encontrou demência em apenas 44,4% dos nossos pacientes [GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. Outros achados clínicos mais comuns em MELAS são a cefaléia e

vômito recorrentes, que ocorrem de 73% até 92,5% dos pacientes, os quais estiveram presentes em todos os casos da nossa amostra [GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. Diante disso, os achados do nosso estudo reforçam a proposta, de HIRANO et al (1992), que a presença de cefaléia e vômito recorrente torna o diagnóstico de MELAS mais seguro. A surdez foi descrita com variação entre 27,5 e 75% dos pacientes, porém apenas 22,2% dos pacientes apresentaram essa manifestação nesse estudo [GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. A fraqueza muscular esteve presente em 55,5% dos nossos pacientes, mas esse sintoma pode ocorrer entre 87,5% e 89% dos pacientes [GOTO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. Em nossa amostra, os demais sintomas isoladamente não foram suficientes para suspeita diagnóstica de MELAS, semelhante ao que foi sugerido por HIRANO et al (1992). A maioria das manifestações clínicas dos pacientes estudados foi semelhante à literatura, sendo que alguns dos achados, como demência, surdez, fraqueza muscular, podem estar com sua freqüência diminuída nesse grupo de pacientes devido à faixa etária precoce de início das manifestações quando comparados a outros estudos, fazendo com que os episódios semelhantes à AVC possam aparecer de forma súbita em crianças aparentemente normais [GOTO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994].

Os sintomas clínicos podem ter freqüência diferente nos pacientes com MELAS dependendo do tipo de mutação ponto do DNAm, como nos pacientes com a mutação T3271C que apresentam menor freqüência de alguns sintomas, como surdez, bem como, a idade de início é mais tardia do que os com a mutação A3243G [TAY et al, 2005]. Esse fato não pode ser

avaliado por esse estudo, uma vez que, não encontramos essa mutação em nossa amostra.

Outros familiares afetados dos pacientes com MELAS podem ser encontrados de 26% até 44%, contudo, outros estudos mostram que a história familiar pode ser positiva em até 86% quando a biópsia muscular ou estudo genético são realizados em familiares assintomáticos ou oligossintomáticos [CIAFALONI et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994]. Na falta de familiar sintomático, biópsia muscular ou estudo genético, familiares oligossintomáticos são difíceis de classificar somente com base nos achados clínicos [CIAFALONI et al, 1992]. Em nosso grupo de pacientes, a história familiar não foi consistente com padrão de herança maternal e nenhum outro familiar tinha a síndrome de MELAS completa, mas os familiares não foram submetidos à biópsia muscular ou estudo genético, dificultando essa classificação.

6.2 EXAME LABORATORIAL

As dosagens séricas da CK e da AL foram normais na maioria dos pacientes em que foram estudadas, 85,7% e 100% respectivamente, refletindo a pouca sensibilidade desse exame para a investigação de pacientes com MELAS. GOTO et al (1992) encontraram CK levemente elevada nos cerca de 25% dos pacientes estudados e discutem que esses níveis podem ficar mais elevados se coletados de pacientes com MELAS após exercício.

O nível sérico do ácido láctico, e particularmente no LCR, é importante no diagnóstico de MELAS porque, como em nossos pacientes, mostra indiretamente a presença de doença mitocondrial em quase todos os pacientes [FINSTERER, 2006; GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994; KAUFMANN et al, 2004]. A acidose láctica sérica tem correlação direta com a gravidade do comprometimento neurológico e particularmente no LCR o ácido láctico parece estar elevado principalmente durante os episódios semelhantes à AVC [FINSTERER, 2006; KAUFMANN et al, 2004]. Em nosso pacientes, o nível de ácido láctico sérico estava elevado no sangue de 75% dos pacientes, dos quais, a determinação foi realizada, mas a literatura mostra elevação em até 97,5% dos casos [GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994; KAUFMANN et al, 2004]. O nível de ácido láctico do LCR foi elevado em apenas um paciente, mas segundo GOTO et al (1992) os pacientes com MELAS podem ter o nível de ácido láctico no LCR em 100% dos casos.

O pequeno número de pacientes que realizou a dosagem de ácido láctico, bem como, o fato da dosagem do ácido láctico ser realizada fora do período em que costumam estar mais elevados (episódios semelhantes à AVC) pode ter influenciado na nossa amostra os níveis menores que os previamente descritos, mesmo assim, esse estudo conseguiu mostrar que existe relação entre o nível elevado do ácido láctico e MELAS. Isso é importante porque valida a pesquisa da elevação do ácido láctico na suspeita diagnóstica de pacientes com MELAS.

6.3 ELETROCARDIOGRAMA

Como mencionado previamente, o envolvimento cardíaco pode ocorrer em até 50% dos pacientes com MELAS, sendo que quando presentes não são uma das principais manifestações clínicas desses pacientes [GOTO et al, 1992; HIRANO & PAVLAKIS, 1994; OKAJIMA et al, 1998; VYDT et al, 2007]. Contudo, todos os pacientes com MELAS deveriam realizar exames cardiológicos de rotina, pois essas alterações cardíacas têm terapêuticas específicas, tendo ainda importante impacto sobre o prognóstico desses pacientes [VYDT et al, 2007]. Nenhum dos nossos pacientes apresentou manifestação clínica sugestiva de cardiopatia, porém a presença de alterações eletrocardiográficas, como a síndrome de Wolf-Parkinson-White ou hipertrofia ventricular esquerda com anormalidade não específica da onda T, puderam ser observadas no eletrocardiograma de alguns dos pacientes que clinicamente estavam assintomáticos do ponto de vista cardiológico.

6.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA

A perda progressiva das fibras musculares, observada nas miopatias, ocasiona o registro de potenciais de ação das unidades motoras de características miopáticas na eletromiografia de agulha [DUMITRO et al, 2002b; WERNECK, 1991; WERNECK & LIMA, 1988]. Como MELAS é uma doença metabólica, onde uma progressiva disfunção mitocondrial acarreta em perda das fibras musculares, acreditamos que os achados da eletromiografia de agulha são variáveis dependendo do momento em que o exame é realizado e

da gravidade da doença. Em pacientes com pouco tempo de evolução a eletromiografia de agulha pode ser normal, porém pacientes com maior tempo de evolução podem apresentar alterações características das miopatias, quando devido à progressão da miopatia mitocondrial, os potenciais de ação de unidade motora apresentam duração e amplitude diminuídas, aumento do número de potenciais polifásicos curtos e do recrutamento das unidades motoras característicos das miopatias (padrão miopático) [WERNECK & LIMA, 1988]. Esse pode ter sido o provável motivo pelo qual apenas um paciente do nosso grupo apresentou padrão miopático típico na eletromiografia de agulha.

A eletromiografia de agulha e o estudo de condução nervosa são consistentes com processo miopático nos pacientes com MELAS, porém neuropatia pode coexistir em alguns pacientes. A presença de polineuropatia axonal ou desmielinizante sensitivo-motora tem sido relatada em pacientes com MELAS [KAUFMANN et al, 2006; RUSANEN et al, 1995]. KARPPA et al (2003) descreve neuropatia, geralmente com associação de lesão axonal e desmielinizante, sugerindo que a sua presença, em 22% dos pacientes com a mutação A3243G, possa ser decorrente de sua disfunção mitocondrial do nervo semelhante ao que ocorre em pacientes com NARP. KAUFMANN et al (2006) encontrou neuropatia, principalmente de predomínio axonal e sensitivo, no estudo da condução nervosa de pacientes com MELAS pela mutação A3243G em 77% da sua amostra, mostrando incidência elevada de neuropatia nesse grupo de pacientes. Ainda a presença de neuropatias focais, como a síndrome do túnel do carpo, também parece ter incidência maior nessa população de pacientes [KARPPA et al, 2003]. Dessa forma, a

neuropatia axonal do nervo facial encontrada na eletromiografia de agulha e estudo da condução nervosa em um dos nossos pacientes também pode estar correlacionada com sua disfunção mitocondrial.

6.5 ESTUDO NEURORADIOLÓGICO

Os estudos radiológicos convencionais de crânio, como tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética, em pacientes com MELAS revelam alterações de substância cinzenta maior que a branca, acometendo principalmente os lobos occipital, parietal e temporal [HAAS & DIETRICH, 2004]. As lesões podem mudar de região, ou até mesmo desaparecer, conforme o tempo de evolução do paciente em relação ao episódio semelhante à AVC [HIRANO & PAVLAKIS, 1994; IIZUKA et al, 2003]. Os estudos radiológicos dos nossos casos não foram realizados durante esses episódios, mas durante o período de melhora dos pacientes, sendo a incidência das lesões unilaterais e bilaterais, bem como, localização preferencial entre os lados direito e esquerdo nessa amostra semelhante entre os pacientes. Contudo, em nossos casos houve predomínio das lesões nas regiões temporal, occipital e parietal, sendo menos freqüente na região frontal, gânglios da base e cerebelo, semelhante aos demais casos descritos na literatura [IIZUKA et al, 2003].

MELAS também podem desenvolver calcificações nos gânglios da base em cerca de 25% dos pacientes, semelhante a baixa incidência encontrada nesse estudo, mas outros estudos revelam incidência de até 40%

na evolução da doença [CIAFALONI et al, 1992; GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992].

6.6 ESTUDO BIOQUÍMICO

O defeito bioquímico mais comum em pacientes com MELAS é a deficiência do complexo I [CIAFALONI et al, 1992; HIRANO et al, 1992]. A deficiência isolada do complexo IV também pode ser encontrada em menor proporção dos pacientes, mas uma combinação de deficiências dos complexos da cadeia respiratória, incluindo do complexo I + II, I + III, I + IV, II + III, I + II + III + IV, é que tem sido encontrada em um terço dos pacientes [CIAFALONI et al, 1992; HIRANO et al, 1992]. Nossos pacientes sugerem combinação da deficiência dos complexos I + II com indícios de possível anormalidade no complexo III, e deficiência do complexo IV, porém apesar do estudo bioquímico muscular não ter sido realizado em todos os casos a presença de deficiência isolada do complexo I não foi encontrada.

6.7 BIÓPSIA MUSCULAR

A biópsia muscular é um importante recurso diagnóstico para MELAS, pois RRF são encontradas em até 97% dos pacientes com essa doença [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992; HIRANO et al, 1992]. O diagnóstico de MELAS foi confirmado em todos os nossos pacientes pela presença de alteração morfológica, com RRF, na biópsia muscular. A frequência de RRF variou conforme a coloração ou reação histoquímica utilizada, sendo encontradas

RRF variando de 0,4% até 10% na coloração pelo TGM e de 0,7% até 11,8% na reação histoquímica para SDH. Também, incidência de RRF acima de 2% foi observada em 55,5% dos pacientes na coloração pelo TGM e em 88,8% dos pacientes na reação histoquímica para SDH. Isso confirma que também nos pacientes com MELAS a reação histoquímica para SDH foi um método diagnóstico superior à coloração pelo TGM para detecção de proliferação mitocondrial, similar ao encontrado em estudos de outras doenças mitocondriais [CIAFALONI et al, 1992].

A deficiência da COX em pacientes com MELAS parece não ser o defeito primário dessa doença. A reação histoquímica para COX demonstrou deficiência apenas em um caso, mas nosso estudo mostrou que um terço dos casos tinham deficiência dessa enzima se considerada também a dosagem bioquímica dessa enzima nos casos onde não foi possível realizar sua reação histoquímica. No paciente que realizou a reação histoquímica para COX, a frequência de fibras COX- foi maior que a de fibras RRF, possivelmente indicando maior número de fibras com possível deficiência funcional do que com alteração morfológica, caracterizada por proliferação mitocondrial.

Os estudos histológicos de pacientes com MELAS, independente do tipo de mutação ponto, tem mostrado incidência de vasos SDH+ de aproximadamente 85% [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992]. Em pacientes brasileiros com MELAS descritos por CONFORTO et al, em 2007, vasos SDH+ foram relatados em um dos seus três casos. Em nosso estudo, a presença de vaso SDH+ na biópsia muscular de pacientes com MELAS foi menor do que a alta incidência descrita pela literatura. Talvez, o menor tempo de evolução dos nossos casos, quando comparado a outros estudos como o de HASEGAWA

et al, em 1991, tenha influenciado esse resultado, pois, assim como ocorre na formação das RRF, a presença de proliferação mitocondrial nos vasos provavelmente aumenta com a idade, fazendo com que vasos SDH+ possam ser menos visualizados na infância nesse grupo de pacientes. Esse achado difere de alguns autores que consideram os vasos SDH+ como um dos principais critérios histológicos para o diagnóstico de MELAS mesmo na ausência de RRF típica na biópsia muscular [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992; HASEGAWA et al, 1991]. A presença de grande quantidade de pacientes com deficiência da COX também pode ter contribuído para a menor frequência de vasos SDH+ encontrada por esse estudo, uma vez que esses vasos podem ser menos encontrados em pacientes com mutações em outros genes do DNAMt [ROSSMANITH et al, 2008].

6.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL

Desde os primeiros estudos descrevendo a associação de mutações de ponto no DNAMt com o fenótipo típico de MELAS, por GOTO et al e KOBAYASHI et al, em 1990, a mutação ponto A3243G é a mais freqüente em pacientes com MELAS sendo encontrada em cerca de 80% dos casos [GOTO, 1995]. No Brasil CONFORTO et al, em 2007, descreveram a associação do fenótipo de MELAS com a mutação A3243G em seus três pacientes. Nossa amostra também contribui para afirmar que essa mutação é a mais freqüente associada com o fenótipo típico de MELAS em nosso meio, porém poucos casos foram acrescentados à literatura nacional para confirmar a incidência

elevada dessa mutação no Brasil, provavelmente pela raridade dessa doença.

A segunda mutação mais freqüente em pacientes com MELAS, a mutação ponto T3271C, foi descrita em cerca de 7,5% dos casos [GOTO, 1995]. Apesar de não ter sido encontrada em nossa amostra, essa mutação também foi relatada por MARIE et al, em 1994, acometendo uma família brasileira com MELAS.

A presença de outras mutações, como as conhecidas mutações ponto nas posições 3252, 3256, 3260 ou 3291 do DNAm_t, não foram encontradas no estudo molecular do gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t em nossos pacientes [GOTO et al, 1994; MORTEN et al, 1993; NISHINO et al, 1996; SATO et al, 1994].

Interessante notar que dois dos pacientes onde não foi encontrada mutação no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t apresentavam deficiência da COX, sugerindo que a presença da deficiência do complexo IV da cadeia respiratória nesses pacientes poderia estar associada com mutação de outro gene do DNAm_t, porém nossa amostra é pequena para comprovar esta hipótese. Da mesma forma, outro paciente sem a mutação do gene tRNA^{Leu (UUR)}, apresentava o estudo bioquímico muscular compatível com combinação da deficiência dos complexos I + II, cujo DNAm_t não foi analisado para os genes que codificam o complexo I.

Tanji et al. (2008) acreditam que nos pacientes com MELAS, que apresentam RRF com deficiência da COX ou ausência de vasos SDH+, o gene suspeito de mutação não deve ser o tRNA^{Leu (UUR)}, e que nessas situações o restante do DNAm_t deva ser analisado em busca de outras mutações [ROSSMANITH et al, 2008]. Portanto, a possibilidade de outras

mutações acometendo o DNAm_t não foi afastada pelo presente estudo, pois no momento existem muitas mutações associadas a MELAS (Tabela 2), mas que por razões técnicas não foram estudadas, pois procuramos enfatizar nossa busca nas mais freqüentes do gene tRNA^{Leu (UUR)}.

A suspeita de MELAS pode ser feita com base nas alterações encontradas com avaliação clínica, exame laboratorial, eletrocardiograma, eletroneuromiografia e análise neuroradiológica, sendo confirmada pelo estudo bioquímico, biópsia muscular e estudo molecular do DNAm_t. A dificuldade e diversidade técnica na realização do estudo bioquímico não fazem dele rotina na maioria dos casos. Mesmo reconhecendo os diversos avanços do estudo molecular nas doenças mitocondriais, nosso estudo destaca o papel da biópsia muscular como o principal recurso diagnóstico, pois embora a pesquisa de mutação no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t tenha resultados significativos quando o DNAm_t é extraído a partir de músculo acometido pela doença, a pesquisa de RRF na biópsia muscular ainda mostra-se superior aos resultados do estudo molecular para o diagnóstico de MELAS. Isso pode ser observado principalmente na reação histoquímica para SDH, onde 88,8% dos nossos pacientes apresentavam RRF com freqüência acima de 2% na biópsia muscular enquanto que mutação no gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t foi encontrada em 50% da amostra estudada.

Dessa forma, nosso estudo pode mostrar que pacientes com suspeita clínica ou laboratorial de MELAS deveriam ser submetidos à biópsia muscular para diagnóstico da doença, podendo o material ser posteriormente utilizado para análise molecular, naqueles onde RRF foram encontradas. Apesar da avaliação dos familiares dos pacientes com diagnóstico de MELAS não ser o

enfoque deste estudo, podemos sugerir que o estudo molecular seria ferramenta útil para auxiliar o aconselhamento genético e a triagem dos demais familiares que podem estar acometidos, de forma incompleta, pela síndrome de MELAS.

7 CONCLUSÕES

7.1 Existe variação nas manifestações clínicas entre os pacientes, sendo que alterações típicas de MELAS, como sinais de encefalopatia ou episódios semelhantes à AVC em idade jovem, são encontradas em todos os pacientes;

7.2 A presença de episódios de cefaléia e vômitos recorrentes pode ser considerada critério de inclusão para MELAS;

7.3 Nível elevado de ácido láctico é encontrado como alteração típica de MELAS;

7.4 A falta de alterações no eletrocardiograma e na eletroneuromiografia, bem como, a normalidade do nível sérico da CK não afasta o diagnóstico de MELAS;

7.5 A localização radiológica das lesões semelhantes à AVC nas regiões temporal, occipital e parietal são as mais sugestivas dessa doença;

7.6 A deficiência de COX pode ocorrer em pacientes com MELAS;

7.7 Nos pacientes com MELAS a reação histoquímica para SDH é superior à coloração pelo TGM na identificação de RRF;

7.8 A falta de vasos SDH+ na biópsia muscular não exclui o diagnóstico da doença;

7.9 A mutação ponto A3243G do DNAm^t é a mais freqüente relacionada com MELAS;

7.10 A análise isolada de mutações do gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t não afasta o diagnóstico de síndrome de MELAS; e

7.11 O uso da biópsia muscular como método diagnóstico de MELAS ainda se revela superior ao da pesquisa de mutações do gene tRNA^{Leu (UUR)} do DNAm_t.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Yoshimura H, Tanaka H, Fujita N, Hikita T, Sakoda S. Comparison of conventional and diffusion-weighted MRI and proton MR spectroscopy in patients with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like events. *Neuroradiology* 2004; 46: 113-117.

Abu-Amero KK, Ozand PT, Al-Dhalaan H. Novel mitochondrial DNA transversion mutation in transfer ribonucleic acid for leucine 2 (CUN) in a patient with the clinical features of MELAS. *J Child Neurol* 2006; 21: 971-972.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465.

Barbiroli B, Montagna P, Cortelli P, Funicello R, Iotti S, Monari L. Abnormal brain and muscle energy metabolism shown by ³¹P magnetic resonance spectroscopy in patients affected by migraine with aura. *Neurology* 1992;42:1209-1214.

Bataillard M, Chatzoglou E, Rumbach L, Sterneberg D, Tournade A, Laforet P, Jardel C, Maisonobe T, Lombes A. Atypical MELAS syndrome associated with a new mitochondrial tRNA glutamine point mutation. *Neurology* 2001; 56: 405-407.

Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002; 59: 1406-1411.

- Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-All Z, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006; 32: 359-373.
- Blakely EL, de Silva R, King A, Schwarzer V, Harrower T, Dawidek G, Turnbull DM, Taylor RW. LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial MTND1 gene mutation. *Eur J Hum Genet* 2005; 13: 623-627.
- Bourgeois JM, Tarnopolsky MA. Pathology of the skeletal muscle in mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2004; 4: 441-452.
- Campos Y, Garcia-Silva T, Barrionuevo CR, Cabello A, Muley R, Arenas J. Mitochondrial DNA deletion in a patient with mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) and Fanconi's syndrome. *Pediatr Neurol* 1995; 13: 69-72.
- Campos Y, Lorenzo G, Martin MA, Torregrosa A, del Hoyo P, Rubio JC, Garcia A, Arenas J. A mitochondrial tRNALys gene mutation (T8316C) in a patient with mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 493-496.
- Campos Y, Martin MA, Rubio JC, Gutierrez del Olmo MC, Cabello A, Arenas J. Bilateral striatal necrosis and MELAS associated with a new T3308C mutation in the mitochondrial ND1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 323-325.
- Canafoglia L, Franceschetti S, Antozzi C, Carrara F, Farina F, Granata T, Lamantea E, Savoardo M, Uziel G, Villani F, Zeviani M, Avanzini G. Epileptic phenotypes associated with mitochondrial disorders. *Neurology* 2001; 56: 1340-1346.
- Chinnery PF, Elliott C, Green G, Rees A, Coulthard A, Turnbull DM, et al. The spectrum of hearing loss due to mitochondrial DNA defects. *Brain* 2000; 123: 82-92.

- Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Silvestri G, Hirano M, Simonetti S, Angelini C, Donati MA, Garcia C, Martinuzzi A, Mosewich R, Servidei S, Zammarchi E, Bonilla E, De Vivo DC, Rowland LP, Schon EA, DiMauro S. MELAS: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *Ann Neurol* 1992; 31: 391-398.
- Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 453-478.
- Collins S, Dennett X, Byrne E. Contrasting histochemical features of various mitochondrial syndromes. *Acta Neurol Scand* 1995; 91: 287-293.
- Conforto AB, Yamamoto FI, Oba-Shinjo SM, Pinto JGC, Hoshino M, Scaff M, Marie SKN. Screening for MELAS mutations in young patients with stroke of undetermined origin. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65: 371-376.
- Corona P, Antozzi C, Carrara F, D'Incerti L, Lamantea E, Tiranti V, Zeviani M. A novel mtDNA mutation in the ND5 subunit of complex I in two MELAS patients. *Ann Neurol* 2001; 49: 106-110.
- Crimi M, Galbiati S, Moroni I, Bordoni A, Perini MP, Lamantea E, Sciacco M, Zeviani M, Biunno I, Moggio M, Scarlato G, Comi GP. A missense mutation in the mitochondrial ND5 gene associated with a Leigh-MELAS overlap syndrome. *Neurology* 2003; 60: 1857-1861.
- Cunha FMB, Werneck MCM, Scola RH, Werneck LC. Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle Nerve* 2006; 33: 409-414.
- De Coo IF, Renier WO, Ruitenbeek W, Ter Laak HJ, Bakker M, Schagger H, Van Oost BA, Smeets HJ. A 4-base pair deletion in the mitochondrial cytochrome b gene associated with parkinsonism/MELAS overlap syndrome. *Ann Neurol* 1999; 45: 130-133.
- Deschauer M, Muller T, Wieser T, Schulte-Mattler W, Kornhuber M, Zierz S. Hearing impairment is common in various phenotypes of the mitochondrial DNA A3243G mutation. *Arch Neurol* 2001; 58: 1885-1888.

- Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23: 247-263.
- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985; 17: 521.
- DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658: 80-88.
- Dubowitz V, Pearse AGE. A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Histochemie* 1960; 2: 105-117.
- Dubowitz V. Histological and histochemical stains and reactions. In: Dubowitz V. *Muscle biopsy: practical approach*. London: Baillière Tindall, 1985. p. 19-40.
- Dumitru D, Amato AA, Zwarts M. Nerve conduction studies. In: Dumitru D, Amato AA, Zwarts M. *Electrodiagnostic medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2002. p.159-223.
- Dumitru D, Zwarts M. Needle electromyography. In: Dumitru D, Amato AA, Zwarts M. *Electrodiagnostic medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, 2002. p.257-291.
- Engel WK, Cunningham GG. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 1963; 13: 919-923.
- Estivill X, Govea N, Barcelo A, Badenas C, Romero E, Moral L, Scozzri R, D'Urbano L, Zeviani M, Torroni A. Familial progressive sensorineural deafness in mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhance by treatment with aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 27-35.
- Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 679-699.

- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 2003; 88: 41-56.
- Finsterer J. Central nervous system manifestations of mitochondrial disorders. *Acta Neurol Scand* 2006; 114: 217-238.
- Finsterer J. Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA^{Leu}(UUR) mutation. *Acta Neurol Scand* 2007; 116: 1-14.
- Fischel-Godsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss: paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 15-19.
- Freund AA. Diagnóstico molecular das ataxias espinocerebelares tipo 1, 2, 3, 6 e 7: estudo populacional e em indivíduos com suspeita clínica. Tese (doutorado). 2007. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Fujimoto S, Mizuno K, Shibata H, Kanayama M, Kobayashi M, Sugiyama N, Ban K, Ishikawa T, Itoh T, Togari H, Wada Y. Serial electroencephalographic findings in patients with MELAS. *Pediatr Neurol* 1999; 20: 43-48.
- Gilchrist JM, Sikirica M, Stopa E, Shanske S. Adult-onset MELAS. Evidence for involvement of neurons as well as cerebral vasculature in strokelike episodes. *Stroke* 1996; 27: 1420-1423.
- Goto Y, Horai S, Matsuoka T, Koga Y, Nihei K, Kobayashi M, Nonaka I. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS): a correlative study of the clinical features and mitochondrial DNA mutation. *Neurology* 1992; 42: 545-550.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta* 1991; 1097: 238-240.

- Goto Y, Tsugane K, Tanabe Y, Nonaka I, Horai S. A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:1624-1630.
- Goto Y. Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve* 1995; Suppl 3: S107-S112.
- Goto YI, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348: 651-653.
- Haas R, Dietrich R. Neuroimaging of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2004; 4: 471-490.
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Mitochondrial encephalopathies: molecular genetic diagnosis from blood samples. *Lancet* 1991; 337: 1311-1313.
- Hanna MG, Nelson IP, Morgan-Hughes JA, Wood NW. MELAS: a new disease associated mitochondrial DNA mutation and evidence for further genetic heterogeneity. *J Neuro Neurosurg Psychiatry* 1998; 65: 512-517.
- Hao R, Yao YN, Zheng YG, Xu MG, Wang ED. Reduction of mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) aminoacylation by some MELAS-associated mutations. *FEBS* 2004; 578: 135-139.
- Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscle from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Ann Neurol* 1991; 29: 601-605.
- Hirano M, Pavlakis SG. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): current concepts. *J Child Neurol* 1994; 9: 4-13.

- Hirano M, Ricci E, Koenigsberger MR, Defendini R, Pavlakis SG, DeVivo DC, DiMauro S, Rowland LP. MELAS: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul Disord* 1992; 2: 125-135.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-719.
- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT. Coupled leading- and lagging-strang synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 2000; 100: 515-524.
- Iizuka T, Sakai F, Kan S, Suzuki N. Slowly progressive spread of the stroke-like lesions in MELAS. *Neurology* 2003; 61: 1238-1244.
- Iizuka T, Sakai F, Suzuki N, Hata T, Tsukahara S, Fukuda M, Takiyama Y. Neuronal hyperexcitability in stroke-like episodes of MELAS syndrome. *Neurology* 2002; 59: 816-824.
- Iizuka T, Sakai F. Pathogenesis of stroke-like episodes in MELAS: analysis neurovascular cellular mechanisms. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2: 29-45.
- Kamada K, Takeuchi F, Houkin K, Kitagawa M, Kuriki S, Ogata A, Tashiro K, Koyanagi I, Mitsumori K, Iwasaki Y. Reversible brain dysfunction in MELAS: MEG, and HMRS analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 70: 675-678.
- Karkos PD, Waldron M, Johnson IJ. The MELAS syndrome. Review of the literature: the role of otologist. *Clin Otolaryngol* 2004; 29: 1-4.
- Karppa M, Syrjala P, Tolonen U, Majamaa K. Peripheral neuropathy in patients with the 3243A>G mutation in mitochondrial DNA. *J Neurol* 2003; 250: 216-221.
- Kaufmann P, Pascual JM, Anziska Y, Gooch CL, Engelstad K, Jhung S, DiMauro S, De Vivo DC. Nerve conduction abnormalities in patients with MELAS and the A3243G mutation. *Arch Neurol* 2006; 63: 746-748.

- Kaufmann P, Shungu DC, Sano MC, Jhung S, Engelstad K, Mitsis E, Mao X, Shanske S, Hirano M, DiMauro S, De Vivo DC. Cerebral lactic acidosis correlates with neurological impairment in MELAS. *Neurology* 2004; 62: 1297-1302.
- Kirby D M, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull DM, Thorburn DR, Taylor RW. Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 2004; 41: 784-789.
- Kobayashi M, Morishita H, Sugiyama N, Yokochi K, Nakano M, Wada Y, Hotta Y, Terauchi A, Nonaka I. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome and NADH-CoQ reductase deficiency. *J Inherit metab Dis* 1986; 9: 301-304.
- Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, Kagawa Y, Ohta S. A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 173: 816-822.
- Koenigsberger MR, Pellock JM, DiMauro S, et al. Juvenile mitochondrial myopathy, short stature and lactic acidosis: a clinical, biochemical, and ultrastructural study. Fifth Annual Meeting of the Child Neurological Society, Moterey, CA, October, 1976.
- Kolb SJ, Costello F, Lee AG, White M, Wong S, Schwartz ED, Messe SR, Ellenbogen J, Kasner SE, Galetta SL. Distinguishing ischemic stroke from the stroke-like lesions of MELAS using apparent diffusion coefficient mapping. *J Neurol Sci* 2003; 216: 11-15.
- Kuwabara T, Watanabe H, Tanaka K, Tsuji S, Ohkubo M, Ito T. Mitochondrial encephalomyopathy: elevated visual cortex lactate unresponsive to photic stimulation – a localized ¹H-MRS study. *Neurology* 1994;44:557-559.

- Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet* 1997; 11: 450-455.
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989; 1: 642-645.
- Liolitsa D, Rahman S, Benton S, Carr LJ, Hanna MG. Is the mitochondrial complex I ND5 gene a hot-spot for causing mutations? *Ann Neurol* 2003; 53: 128-132.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster 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* 1962; 41: 1776-1804.
- Manfredi G, Schon EA, Bonilla E, Moraes CT, Shanske S, DiMauro S. Identification of a mutation in the mitochondrial tRNA(Cys) gene associated with mitochondrial encephalopathy. *Hum Mutat* 1996; 7: 158-163.
- Manfredi G, Schon EA, Moraes CT, Bonilla E, Berry GT, Sladky JT, DiMauro S. A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 391-398.
- Marie SKN, Goto Y, Passos-Bueno MR, Zatz M, Carvalho AAS, Carvalho M, Levy JA, Palou VB, Campiotto S, Horai S, Nonaka I. A caucasian family with the 3271 mutation in mitochondrial DNA. *Biochem Med Metabol Biol* 1994; 52: 136-139.
- Matsuoka T, Goto Y, Hasegawa H, Nonaka I. Segmental cytochrome c oxidase deficiency in CPEO: teased muscle fiber analysis. *Muscle Nerve* 1992; 15: 209-213.

- McDonnell MT, Schaefer AM, Blakely EL, McFarland R, Chinnery PF, Turnbull DM and Taylor RW. Noninvasive diagnosis of the 3243A>G mitochondrial DNA mutation using urinary epithelial cells. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 778-781.
- Meissner C, Bruse P, Oehmichen M. Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age. *Experiment Gerontol* 2006; 41: 518-524.
- Melone MA, Tessa A, Petrini S, Lus G, Sampaolo S, di Fede G, Santorelli FM, Cotrufo R. Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/MERRF phenotype. *Arch Neurol* 2004; 61: 269-272.
- Menotti F, Brega A, Diegoli M, Grasso M, Modena MG, Arbustini E. A novel mtDNA point mutation in tRNA(Val) is associated with hypertrophic cardiomyopathy and MELAS. *Ital Heart J* 2004; 5: 460-465.
- MITOMAP database. Avaliado em: <http://www.mitomap.org> (acesso em 15 de fevereiro de 2008).
- Mizukami K, Sasaki M, Suzuki T, Shiraishi H, Koizumi J, Ohkoshi N, Ogata T, Mori N, Ban S, Kosaka K. Central nervous system changes in mitochondrial encephalomyopathy: light and electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 1992; 83: 449-452.
- Molnar MJ, Valikovics A, Molnar S, Tron L, Dioszeghy P, Mechler F, Gulyas B. Cerebral blood flow and glucose metabolism in mitochondrial disorders. *Neurology* 2000; 55: 544-548.
- Moraes CT, Ricci E, Petruzzella V, Shanske S, DiMauro S, Shon EA, Bonilla E. Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nature Genet* 1992; 1: 359-367.
- Morten KJ, Cooper JM, Brown GK, Lake BD, Pike D, Poulton J. A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 2081-2087.

- Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP. Neocortical spreading depression provokes the expression of C-fos protein-like immunoreactivity within the trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci* 1993;13:1167-1677.
- Naini AB, Lu J, Kaufmann P, Bernstein RA, Mancuso M, Bonilla E, Hirano M, DiMauro S. Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. *Arch Neurol* 2005; 62: 473-476.
- Nakamura N, Nakano S, Goto Y, Ozawa M, Nagahama Y, Fukuyama H, Akiguchi I, Kaji R, Kimura J. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA (Ser(UCN)) gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214: 86-93.
- Nishino I, Komatsu M, Kodama S, Horai S, Nonaka I, Goto Y. The 3260 mutation in mitochondrial DNA can cause mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Muscle Nerve* 1996; 19: 1603-1604.
- Nishioka J, Akita Y, Yatsuga S, Katayama K, Matsuishi T, Ishibashi M, Koga Y. Inappropriate intracranial hemodynamics in the natural course of MELAS. *Brain Develop* 2008; 30: 100-105.
- Ohama E, Ohara S, Ikuta F, Tanaka K, Nishizawa M, Miyatake T. Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neuropathol* 1987; 74: 226-233.
- Okajima Y, Tanabe Y, Takayanagi M, Aotsuka H. A follow up study of myocardial involvement in patients with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Heart* 1998; 80: 292-295.
- Olson W, Engel WK, Walsh GO, Einaugler R. Oculocraniosomatic neuromuscular disease with "ragged-red" fibers. Histochemical and ultrastructural changes in limb muscles of a group of patients with idiopathic progressive external ophthalmoplegia. *Arch Neurol* 1972; 26: 193-211.

- Oppenheim C, Galanaud D, Samson Y, . Can diffusion weighted magnetic resonance imaging help differentiate stroke from stroke-like events in MELAS? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 69: 248-250.
- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, DeVivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984; 16: 481-488.
- Pedroso FC. Caracterização de miopatias mitocondriais através da avaliação das atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo energético. Dissertação (mestrado). 1995. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Pedroso FC, Campello AP, Werneck LC, Klüppel ML. Characterization of mitochondrial myopathies through the evaluation of the enzymatic activities involved in energy metabolism. *Arq Neuropsiquiatr* 1997; 55: 249-257.
- Petruzzella V, Moraes CT, Sano MC, Bonilla E, DiMauro S, Schon EA. Extremely high levels of mutant mtDNAs co-localize with cytochrome c oxidase-negative ragged-red fibers in patients harboring a point mutation at nt 3243. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 449-454.
- Ravn K, Wibrand F, Hansen FJ, Horn N, Rosenberg T, Schwartz M. An mtDNA mutation, 14453 A>G, in the NADH dehydrogenase subunit 6 associated with severe MELAS syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 805-809.
- Ribacoda R, Salas-Puig, Gonzales C, Astudillo A. Características del estado del mal epileptico en MELAS. Analisis de cuatro casos. *Neurologia* 2006; 21: 1-11.
- Rossmannith W, Freilinger M, Roka J, Raffelsberger T, Moser-Thier K, Prayer D, Bernert G, Bittner RE. Isolated cytochrome c oxidase deficiency as a cause of MELAS. *J Med Genet* 2008; 45: 117-121.

- Rusanen H, Majamaa K, Tolonen U, Remes AM, Myllyla R, Hassinen IE. Demyelinating polyneuropathy in a patient with the tRNA^{Leu}(UUR) mutation at base pair 3243 of the mitochondrial DNA. *Neurology* 1995; 45: 1188-1192.
- Sakuta R, Honzawa S, Murakami N, Goto Y, Nagai T. Atypical MELAS associated with mitochondrial tRNA(Lys) gene A8296G mutation. *Pediatr Neurol* 2002; 27: 397-400.
- Sakuta R, Nonaka I. Vascular involvement in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1989; 25: 594-601.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory 1989; 2:9.16-9.19.
- Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP, DiMauro S. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238: 326-328.
- Sappey-Marinier D, Calabrese G, Fein G, Hugg JW, Biggins C, Weiner MW. Effect of photic stimulation on human visual cortex lactate and phosphates using ¹H and ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12:584-92.
- Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 1999; 283: 1488-1493.
- Sato W, Hayasaka K, Shoji Y, Takahashi T, Takada G, Saito M, Fukawa O, Wachi E. A mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation at 3256 associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochem Mol Biol Int* 1994; 33: 1055-1061.
- Sato W, Tanaka M, Sugiyama S, Nemoto T, Harada K, Miura Y, Kobayashi Y, Goto Y, Takada G, Ozawa T. Cardiomyopathy and angiopathy in patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Am Heart J* 1994; 128: 733-741.

- Schmiedel J, Jackson S, Schafer J, Reichmann H. Mitochondrial cytopathies. *J Neurol* 2003; 250: 267-277.
- Sciaccio M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT. Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 13-19.
- Scola RH, Pereira ER, Lorenzoni PJ, Werneck LC. Toxic myopathies: muscle biopsy features. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65: 82-86.
- Servidei S. Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 277-282.
- Shapira Y, Cederbaum SC, Cancilla, Nielsen D, Lippe BM. Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy, and lactate acidemia. *Neurology* 1975; 25: 614-621.
- Shapira Y, Harel S, Russel A. Mitochondrial encephalomyopathies: a group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. *Isr J Med Sci* 1977; 13: 161-164.
- Shultz BE, Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; 30: 23-65.
- Shy GM, Gonatas NK, Perez M. Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain* 1966; 89: 133-158.
- Shy GM, Gonatas NK. Human myopathy with giant abnormal mitochondria. *Science* 1964; 145: 493-496.
- Sparaco M, Bonilla E, DiMauro S, Powers JM. Neuropathology of mitochondrial encephalopathies due to mitochondrial DNA defects. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 1-10.

- Sue CM, Lipsett LJ, Crimmins DS, Tsang CS, Boyages SC, Presgrave CM, Gibson WC, Byrne E, Morris JG. Cochlear origin of hearing loss in MELAS syndrome. *Ann Neurol* 1998; 43: 350-359.
- Sue CM, Quigley A, Katsabanis S, Kapsa R, Crimmins DS, Byrne E, Morris JGL. Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. *J Neurol Sci* 1998; 161: 36-39.
- Tanahashi C, Nakayama A, Yoshida M, Ito M, Mori N, Hashizume Y. MELAS with the mitochondrial DNA 3243 point mutation: a neuropathological study. *Acta Neuropathol* 2000; 99: 31-38.
- Tanji K, Kaufmann P, Naini AB, Lu J, Parsons TC, Wang D, Willey JZ, Shanske S, Hirano M, Bonilla E, Khandji A, DiMauro S, Rowland LP. A novel tRNA^{Val} mitochondrial mutation causing MELAS. *J Neurol Sci* 2008; 270: 23-27.
- Tay SKH, Shanske S, Grove C, Shanske A, Schafer I, Pancrudo J, Lu J, Bonilla E, DiMauro S. Clinical and genetic features in two families with MELAS and the T3271C mutation in mitochondrial DNA. *J Child Neurol* 2005; 20: 142-146.
- Taylor RW, Chinnery PF, Haldane F, Morris AA, Bindoff LA, Wilson J, Turnbull DM. MELAS associated with a mutation in the valine transfer RNA gene of mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 1996; 40: 459-462.
- Thorburn DR, Dahl HH. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 2001; 106: 102-114.
- Tokunaga M, Mita S, Murakami T, Kumamoto T, Uchino M, Nonaka I, Ando M. Single muscle fiber analysis of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Ann Neurol* 1994; 35: 413-419.
- Tokunaga M, Mita S, Sakuta R, Nonaka I, Araki S. Increased mitochondrial DNA in blood vessels and ragged-red fibers in mitochondrial myopathy,

- encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Ann Neurol* 1993; 33: 275-280.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 1996; 16: 877-885.
- Tzen CY, Thajeb P, Wu TY, Chen SC. MELAS with point mutations involving tRNA^{Leu} (A3243G) and tRNA^{Glu} (A14693G). *Muscle Nerve* 2003; 28: 575-581.
- Vydt TGC, Coe RFM, Soliman OII, et al. Cardiac involvement in adults with m.3243A>G MELAS gene mutation. *Am J Cardiol* 2007; 99: 264-269.
- Walker UA, Collins S, Byrne E. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur Neurol* 1996; 36: 260-267.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, Elsas II LJ, Nikoskelainen EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242: 1427-1430.
- Wallace DC, Zheng X, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, Hopkins LC. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 1988; 55: 601-610.
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; 283: 1482-1487.
- Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992; 256: 628-632.
- Watanabe H, Kuwabara T, Ohkubo M, Tsuji S, Yuasa T. Elevation of cerebral lactate detected by localized ¹H-magnetic resonance spectroscopy in migraine during the interictal period. *Neurology* 1996;47:1093-1095.
- Werneck LC. O valor da biópsia muscular em neurologia: análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. *Rev Bras Clin Ter* 1981; 10(Suppl): 2-24.

- Werneck LC. Estudo da biópsia muscular e sua correlação com enzimas séricas e eletromiográficas nas doenças neuromusculares. 1991. Tese (Concurso para Professor Titular do Departamento de Clínica Médica) – Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Werneck LC, Abdalla H, Lohr A. MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes): case report. *Arq Neuropsiquiatr* 1987; 45: 288-294.
- Werneck LC, Lima JGC. Muscle biopsy correlated with electromyography: study of 100 cases. *Arq Neuropsiquiatr* 1988; 46 156-165.
- Yoneda M, Maeda M, Kimura H, Fujii A, Katayama K, Kuriyama M. Vasogenic edema on MELAS: a serial study with diffusion-weighted MR imaging. *Neurology* 1999; 53: 2182-2184.
- Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004; 127: 2153-2172.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346.
- Zeviani M, Muntoni F, Savarese N, Serra G, Tiranti V, Carrara F, Mariotti C, DiDonato S. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. *Eur J Hum Genet* 1993; 1: 80-87.

9 APÊNDICE

9.1 PREPARO DE SOLUÇÕES PARA BIOLOGIA MOLECULAR

As soluções foram descritas abaixo conforme a rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

- Acetato de Sódio 3M: Dissolver 24,1 g de acetato de sódio em água destilada e deionizada q.s.p. 100 ml.
- Etanol 70%: Misturar 70 ml de etanol absoluto em 30 ml de água destilada e deionizada.
- Fenol Saturado: Liquefazer o fenol a 65 °C. Depois de liquefeito, adicionar a mesma quantidade de Tris 50mM pH 10,0 e deixar agitando durante a noite. Deixar em repouso por 30 minutos e retirar a fase aquosa (superior). Adicionar a mesma quantidade de Tris HCl 50 mM pH 8,0 e deixar agitando por 2 horas. Decorrido o tempo esperar 30 minutos e medir o pH do fenol (fase inferior) que deverá ser em torno de 7,6 ou 8,0 (caso não esteja repetir as duas etapas acima).
- Proteinase K 5mg/ml: Dissolver 10mg de proteinase K em 1 ml de Tampão TE e adicionar 1 ml de glicerol estéril. Armazenar a -20 °C.
- RSB: Tris-HCl pH7,6 1M 0,5ml; KCl 1M 0,25ml; MgCl₂ 1M 0,5ml; Água destilada qsp 50ml.

- SDS 10%: Dissolver 10g de SDS em água destilada e deionizada (q.s.p. 100ml) com auxílio do banho-maria de 55 °C. Armazenar a 4 °C. Aquecer a solução no momento do uso.
- SEVAG: 48ml de Clorofórmio; 2ml de álcool isoamílico.
- Solução de Lise de Eritrócitos (SLE): TRIS pH7,6 10mM; MgCl₂ 5mM e NaCl 10mM.
- Tampão TBE 10X: Ácido Bórico 11,25g; Tris 27,0g; Solução EDTA 0,5M 10ml; Água destilada qsp 250ml.
- Tampão TBE 1X: 1 parte de TBE 10X; 9 partes de água destilada.
- Tampão TE: TRIS pH7,6 10mM e EDTA pH8,0 0,1 mM.

9.2 PREPARO DAS COLORAÇÕES E REAÇÕES HISTOQUÍMICAS

As técnicas foram realizadas conforme a rotina do Laboratório de Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sendo as soluções descritas a seguir:

9.2.1 Hematoxilina e Eosina (HE)

- Solução de Eosina: Eosina 1g + Água destilada 100ml.
- Solução de Hematoxilina: Cristais de Hematoxilina 5g + Álcool Absoluto 50ml + Alumen de Potássio 100g + Água Destilada 1000ml + Óxido Vermelho de Mercúrio 2,5g.
- Dissolver a hematoxilina no álcool e o alumen na água sob aquecimento. Misturar as duas soluções e aquecer até quase ebulição

o mais rápido possível. Retirar do calor e juntar o óxido de mercúrio lentamente, reaquecer até ficar púrpura escuro, esfriar em banho maria e filtrar para uso. Sempre que for usar a hematoxilina retirar uma possível camada superficial, como se fosse uma nata, com auxílio de um papel filtro. As soluções devem ser misturadas até a completa dissolução.

9.2.2 Tricromo de Gomori modificado (TGM)

- Solução do Tricromo: Fast Green FCF 0,3g + Cromatrópico RR 0,6g + Ácido Fosfotúnstico 0,6g + Ácido Acético Glacial 1ml + Água Destilada 100ml.
- Ajustar o pH para 3,4 e misturar bem até que os ingredientes estejam completamente dissolvidos.
- Solução de Hematoxilina: Cristais de Hematoxilina 5g + Álcool Absoluto 50ml + Alumen de Potássio 100g + Água Destilada 1000ml + Óxido Vermelho de Mercúrio 2,5g.

9.2.3 Desidrogenase succínica (SDH)

- Solução de Succinato de Sódio 0,2M: Succinato de Sódio 32,4g + Água Destilada 1000ml.
- Solução Tampão de Fosfato 0,2M: Fosfato de Sódio 22,6g + Fosfato de Potássio 13g + Água Destilada 1000ml.
- Meio de Incubação: NBT (nitro blue tetrazolium) 10mg + 0,2M Succinato de Sódio 5ml + 0,2M Tampão de Fosfato 5ml.

- Ao proceder as diluições colocar por primeiro o succinato de sódio, para haver a dissolução do NBT, e ajustar o pH do meio de incubação para 7,4.

9.2.4 Citocromo c oxidase (COX)

- Solução de Catalase: Catalase 4mg + Água Destilada 100ml.
- Solução Tampão de Fosfato 0,1M (pH 7,4): 0,1 M Ortofosfato de Hidrogênio Sódio 12ml + 0,1 M Ortofosfato de Hidrogênio Dissódico 8ml.
- Meio de Incubação: 3,3 Diaminobenzedine Tetrahydrochloride (DAB) 10mg + Citocromo C (Type II) 30mg + Sacarose 1,5g + Solução de Catalase 2ml + 0,1 M Tampão de Fosfato 10 ml.

9.3 CARACTERÍSTICAS DO DNAmT EXTRAÍDO DE MÚSCULO

Tabela 10. Características do DNA extraído de material proveniente de biópsia muscular dos pacientes com MELAS.

Caso	Quantidade (ug/ul)	Relação 260 / 280
1	46,5	2,11
4	182,5	1,95
6	40,0	1,90
7	73,0	1,90
8	66,5	1,82
9	90,5	1,77