

PAULO JOSÉ LORENZONI

**MERRF: ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL,
ELETROFISIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Herminia Scola

CURITIBA

2013

L869 Lorenzoni, Paulo José.
MERRF: estudo clínico, laboratorial, eletrofisiológico, morfológico e molecular / Paulo José Lorenzoni. – Curitiba, 2013.
103 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Herminia Scola.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Síndrome MERRF - diagnóstico. 2. Epilepsias mioclônicas. 3. Genes mitocondriais - genética. 4. RNA de transferência de lisina - genética. 5. Mutação. I. Título. II. Scola, Rosana Herminia.

NLM: WL 385



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos vinte dias do mês de setembro do ano de dois mil e treze, a banca examinadora constituída pelos Professores Doutores: **Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira**, **Lineu Cesar Werneck**, **Salmo Raskin**, **Hélio Afonso Ghizoni Teive** e **Dra. Rosana Hermínia Scola** (Orientadora), exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **Paulo José Lorenzoni**, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna nível **Doutorado**, da **Universidade Federal do Paraná**, intitulada: “**MERRF: ESTUDO CLINICO, LABORATORIAL, ELETROFISIOLÓGICO, MORFOLÓGICO E MOLECULAR**”. A Banca examinadora considerou que **Paulo José Lorenzoni**, apresentou trabalho adequado para Tese e o defendeu com segurança e propriedade nas argüições 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 **Doutor em Medicina Interna** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das argüições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Curitiba, 20 de setembro de 2013.

Prof. Dra. **Cláudia F. da Rosa Sobreira**

Prof. Dr. **Lineu Cesar Werneck**

Prof. Dr. **Salmo Raskin**

Prof. Dr. **Hélio Afonso Ghizoni Teive**

Prof. Dra. **Rosana Hermínia Scola**

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 Hermínia 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. Pelos cuidadosos conselhos e todo carinho dispensado na orientação da minha vida acadêmica: Muito Obrigado!!

Ao **Professor Dr Lineu Cesar Werneck**, pioneiro nas doenças neuromusculares, a minha reverência. Continuar seguindo seus passos, é um privilégio.

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

Ao **Professor Dr Carlos Eduardo Soares Silvado**, pela presteza em auxiliar nossos trabalhos, sempre com enfoques diferenciados.

Aos **Professores e Médicos do Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas**, gratidão e respeito pelo acompanhamento na minha formação profissional.

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

Ao **Professor Dr Hélio Afonso Ghizoni Teive**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio em mais essa etapa.

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 DOENÇAS MITOCONDRIAS | 03 |
| 2.2 DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS MITOCONDRIAS | 08 |
| 2.3 MERRF | |
| 2.3.1 Histórico | 11 |
| 2.3.2 Critérios diagnósticos | 12 |
| 2.3.3 Correlação entre alterações clínicas e fisiopatológicas | 13 |
| 2.3.4 Genética mitocondrial | 30 |
| 2.3.5 Alterações laboratoriais e bioquímicas | 34 |
| 2.3.6 Alterações eletrofisiológicas | 36 |
| 2.3.7 Alterações morfológicas | 37 |
| 3 OBJETIVOS | 41 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA | 43 |
| 4.2 EXAME LABORATORIAL | 43 |
| 4.3 ELETROCARDIOGRAMA | 44 |
| 4.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA | 44 |
| 4.5 ELETROENCEFALOGRAMA | 44 |
| 4.6 ESTUDO NEURORRADIOLÓGICO | 45 |
| 4.7 BIÓPSIA MUSCULAR | 45 |
| 4.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL | 47 |
| 4.8.1 Extração do DNAm de amostras de músculo | 47 |
| 4.8.2 Identificação das mutações no DNAm | 49 |
| 5 RESULTADOS | |
| 5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA | 54 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 5.2 | EXAME LABORATORIAL | 57 |
| 5.3 | ELETROCARDIOGRAMA | 58 |
| 5.4 | ELETRONEUROMIOGRAFIA | 58 |
| 5.5 | ELETROENCEFALOGRAMA | 59 |
| 5.6 | ESTUDO NEURORRADIOLÓGICO | 60 |
| 5.7 | BIÓPSIA MUSCULAR | 62 |
| 5.8 | ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL | 65 |
| 5.8.1 | Identificação das mutações no DNAmT | 65 |
| 6 | DISCUSSÃO | |
| 6.1 | AVALIAÇÃO CLÍNICA | 69 |
| 6.2 | EXAME LABORATORIAL | 72 |
| 6.3 | ELETROCARDIOGRAMA | 73 |
| 6.4 | ELETRONEUROMIOGRAFIA | 74 |
| 6.5 | ESTUDO NEURORRADIOLÓGICO | 75 |
| 6.6 | ELETROENCEFALOGRAMA | 76 |
| 6.7 | BIÓPSIA MUSCULAR | 78 |
| 6.8 | ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL | 79 |
| 7 | CONCLUSÕES | 82 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| 9 | APÊNDICE | 100 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Mecanismos de perda neuronal e hiperexcitabilidade | 20 |
| Figura 2 – Mecanismo fisiopatológico das manifestações clínicas | 22 |
| Figura 3 – Heredograma nos casos 2, 4 e 6 | 56 |
| Figura 4 – Aspecto neurorradiológico (IRM) | 61 |
| Figura 5 – Biópsia muscular com RRF pelo TGM | 64 |
| Figura 6 – Biópsia muscular com fibras granulares (SDH+) | 64 |
| Figura 7 – Reação histoquímica para citocromo c oxidase | 64 |
| Figura 8 – Comportamento dos vasos na biópsia muscular | 65 |
| Figura 9 – PCR/RLFP para mutação de ponto A8344G | 68 |
| Figura 10 – Sequenciamento do gene tRNA ^{Lys} | 68 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Manifestações clínicas e classificação genética das principais encefalomiopatias mitocondriais | 07 |
| Tabela 2 – Mutações associadas com fenótipo de MERRF | 34 |
| Tabela 3 – Descrição clínica | 55 |
| Tabela 4 – Resposta ao tratamento | 56 |
| Tabela 5 – Alterações laboratoriais | 57 |
| Tabela 6 – Achados eletrofisiológicos | 59 |
| Tabela 7 – Achados do eletroencefalograma | 60 |
| Tabela 8 – Achados neurorradiológicos | 62 |
| Tabela 9 – Características das fibras musculares e vasos na biópsia muscular | 63 |
| Tabela 10 – Resultado do estudo molecular | 67 |
| Tabela 11 – Características do DNA extraído | 103 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|--|
| ADP | difosfato de adenosina |
| ATP | trifosfato de adenosina |
| ATPase | adenosinatrifosfatase |
| AVC | acidente vascular cerebral |
| bp | pares de base |
| Ca²⁺-ATPase | cálcio ATPase |
| CK | creatina quinase |
| COX | citocromo c oxidase |
| COX- | fibras com deficiência da citocromo c oxidase |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| DNAmt | DNA mitocondrial |
| DNA n | DNA nuclear |
| EEG | eletroencefalograma |
| HE | hematoxilina e eosina |
| IRM | imagem por ressonância magnética |
| LCR | líquido cefalorraquiano |
| MELAS | miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhante à AVC |
| MERRF | mioclonia, epilepsia e fibras vermelhas rasgadas na biópsia muscular |
| NADH | nicotinamida desidrogenase tetrazolium redutase |
| Na⁺/K⁺-ATPase | sódio/potássio ATPase |
| NARP | neuropatia periférica, ataxia e retinopatia pigmentar |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| nt | nucleotídeo |
| PAS | ácido periódico de Schiff |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| PCR/RFLP | PCR com polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição |
| PEO | oftalmoplegia externa progressiva crônica |
| POLG | polimerase gama |
| RNA | ácido ribonucleico |
| RRF | fibras rasgadas vermelhas ou “ragged-red fibers” |
| SDH | desidrogenase succínica |
| SDH+ | reação histoquímica forte para desidrogenase succínica |
| SNC | sistema nervoso central |
| TGM | tricromo de Gomori modificado |
| tRNA | RNA transportador |

RESUMO

Introdução: MERRF é uma doença mitocondrial caracterizada por mioclonia, epilepsia e fibras vermelhas rasgadas (RRF) na biópsia muscular. *Objetivo:* Conhecer as características de pacientes com MERRF, acompanhados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, para: (1) caracterizar suas manifestações clínicas, laboratoriais, eletrofisiológicas e morfológicas; e (2) determinar mutações do gene do RNA transportador de lisina (tRNA^{Lys}) do DNA mitocondrial (DNAMt). *Material e Métodos:* Os 6 pacientes com MERRF foram analisados com base nas manifestações clínicas, laboratoriais, neurorradiológicas, eletrocardiográficas, eletroneuromiográficas e eletroencefalográficas. A biópsia muscular foi avaliada principalmente pelas colorações do tricromio de Gomori modificado (MGT), desidrogenase succínica (SDH) e citocromo c oxidase (COX). O DNAMt foi extraído de material proveniente de biópsia muscular sendo o gene tRNA^{Lys} analisado por reação em cadeia de polimerase com polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR/RLFP) e sequenciamento direto. *Resultados:* O tempo de progressão da doença variou de 2 até 15 anos. Mioclonia e epilepsia estavam presentes em todos os pacientes e os outros sintomas relatados foram ataxia cerebelar, fraqueza muscular, neuropatia periférica, lipomas múltiplos, cefaléia, vômitos, demência, ptose palpebral, oftalmoparesia e intolerância ao exercício. As crises epiléticas foram controladas em todos os pacientes com o uso de medicação antiepilética. O nível de ácido láctico sérico foi aumentado em 5 pacientes. O eletroencefalograma mostra atividade epileptiforme generalizada em 5 pacientes e resposta foto sensitiva generalizada durante a fotoestimulação intermitente em 2 pacientes. O estudo das imagens do crânio revelou atrofia cortical de cérebro e cerebelo em 4 pacientes. As RRF ocorreram em todos os pacientes na coloração pelo MGT e reação pela SDH; sendo a frequência acima de 2% de RRF encontrada em 66,6% dos pacientes tanto na coloração pelo MGT quanto pela SDH. A análise pela reação da COX mostrou atividade deficiente em 5 pacientes. Vasos com forte reação para SDH (SDH+) não foram encontrados. O estudo molecular do gene tRNA^{Lys} por PCR/RLFP e sequenciamento direto mostrou a mutação A8344G no DNAMt em 5 pacientes. *Conclusões:* Os pacientes com MERRF têm variação na apresentação de suas manifestações clínicas, sendo que alterações típicas de MERRF, como mioclonia, epilepsia generalizada, ataxia cerebelar, fraqueza muscular e acidose láctica podem ser encontradas na maioria dos pacientes. A deficiência de COX ocorre na maioria dos pacientes com MERRF. A reação histoquímica para SDH é semelhante à coloração pelo TGM na identificação de RRF. A falta de vasos SDH+ na biópsia muscular não exclui o diagnóstico da doença. A mutação de ponto A8344G do DNAMt é a mais frequente relacionada com MERRF.

ABSTRACT

Background: Myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF) is a mitochondrial disease that is characterized by myoclonic epilepsy with ragged red fibers (RRF) in muscle biopsies. *Objective:* The aim of this study was to analyze Brazilian patients with MERRF at Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná: (1) clinical, laboratorial, electrophysiological and histological findings; (2) mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in tRNA^{Lys} gene; and (3) to compare muscle biopsy and molecular analysis of tRNA^{Lys} gene as diagnostic method to MERRF. *Method:* Study of 6 patients with MERRF with correlation of 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 was obtained from muscle biopsy specimen which was analysed of tRNA^{Lys} gene by PCR/RLFP and direct sequencing. *Results:* The time of disease progression ranged from 2 to 15 years. All patients had myoclonus and seizures. Other symptoms reported were cerebellar ataxia, weakness, peripheral neuropathy, multiple lipomas, headache, vomiting, dementia, ocular ptosis, ophthalmoparesis and exercise intolerance. Seizures were controlled with antiepileptic drugs in all patients. Blood lactate levels was increased in 5 patients. Electroencephalogram studies revealed generalized epileptiform discharges in five patients and generalized photoparoxysmal responses during intermittent photic stimulation in two patients. Brain image study reveals brain and cerebellar atrophy in 4 patients. RRF by MGT and SDH stains occurred in the frequency above 2% in 66.6% of patients on both stain. COX stain analysis showed deficient activity in 5 patients. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels (SSV) did not occur in these cases. The molecular analysis showed the A8344G mutation on mtDNA in 5 patients. *Conclusion:* MERRF patients have variations in their clinical manifestation, but the main dysfunctions, as myoclonus, epilepsy, cerebellar ataxia, weakness and increased lactate levels can be found in MERRF phenotype. COX deficiency frequently occurs in MERRF patients. RRF presence was similarly increased in MGT and SDH stain. Absent SSV in muscle biopsy specimens should not be used as exclusion criteria for MERRF. A8344G point mutation is the most related with the MERRF phenotypic in tRNA^{Lys} gene.

1 INTRODUÇÃO

A mitocôndria é a principal organela responsável pelo fornecimento de energia para manutenção e funcionamento das células. Dessa forma, qualquer distúrbio no seu sistema de fosforilação oxidativa pode provocar alterações sistêmicas em diferentes órgãos, causando as 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 MERRF, denominação que recebe pela associação encontrada entre mioclonia, epilepsia e fibras vermelhas rasgadas na biópsia muscular [DiMAURO et al, 2002; FUKUHARA et al, 1980]. A suspeita de pacientes com MERRF pode ser feita com base nas suas alterações clínicas, laboratoriais, eletrofisiológicas e neurorradiológicas, sendo o diagnóstico confirmado pela biópsia muscular [DiMAURO et al, 2002; FUKUHARA et al, 1980]. Após a descoberta da mutação de ponto A8344G do DNA mitocondrial (DNAm_t) afetando o gene RNA transportador de lisina (tRNA^{Lys}) no músculo de pacientes com MERRF, o estudo molecular do DNAm_t tem sido utilizado para confirmar o diagnóstico da doença, permitir o aconselhamento genético dos familiares e melhorar nossa compreensão sobre os mecanismos moleculares que causam essa doença [LARSSON et al, 1995; SANTORELLI et al, 1996; SHOFFNER & WALLACE, 1992; ZEVIANI & DI DONATO, 2004].

A partir da observação de casos de doença mitocondrial, no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, que apresentavam em comum mioclonia e epilepsia, pesquisamos as mutações do DNAm, 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.

O presente estudo se propõe a investigar pacientes com MERRF caracterizando suas principais manifestações clínicas, laboratoriais e eletrofisiológicas, bem como, analisando a utilização da biópsia muscular e do estudo molecular, especialmente do DNAm, como métodos de diagnóstico das doenças mitocondriais.

Realizamos a revisão da literatura sobre os principais elementos do grupo heterogêneo que compõe as doenças mitocondriais, do seu diagnóstico e dos aspectos fisiológicos e patológicos envolvidos com MERRF, 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 DNAm em busca de novos resultados que possam auxiliar no diagnóstico de pacientes, fornecer subsídios para a compreensão dos mecanismos moleculares das doenças mitocondriais e para vir a representar um primeiro passo para futuros tratamentos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 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 da mitocôndria 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 (SNC) ou o músculo esquelético foram descritas manifestando-se com: retardo psicomotor, crises epiléticas, 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 multissistêmicas, 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 (PEO); síndrome de Kearns-Sayre; síndrome de Pearson; miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes à acidente vascular cerebral (MELAS); mioclonia, epilepsia e 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 no acoplamento do sistema de oxidação-fosforilação (deficiência do complexo V e doença de Luft) [DiMAURO et al, 1985; MORGAN-HUGHES et al, 1988].

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 DNAm_t causando defeitos da fosforilação oxidativa. Apesar do DNAm_t ter sido descoberto cerca de 40 anos atrás e seu seqüenciamento completado em 1981, as mutações do DNAm_t começaram a ganhar destaque em doenças humanas somente após 1988, quando foram descritas mutações do DNAm_t causando doenças com alteração da fosforilação oxidativa em pacientes com neuropatia óptica hereditária de Leber, PEO e síndrome de Kearns-Sayre [HOLT 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 DNAm_t 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 DNAm_t foram identificadas [HOLT et al, 1988; WALLACE et al, 1988a; WALLACE et al, 1988b; ZEVIANI et al, 1988].

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

| | Fenótipo |
|------------------------|---|
| Rearranjos do DNAm | |
| OEPC | Ptose palpebral, oftalmoparesia, fraqueza muscular |
| Kearns-Sayre | Ptose palpebral, oftalmoparesia, fraqueza muscular, retinopatia pigmentar, ataxia, neuropatia, cardiomiopatia, bloqueio de condução cardíaco, baixa estatura, hiperproteínoorraquia |
| Mutações ponto do DNAm | |
| MELAS | Episódios semelhantes à acidente vascular cerebral, encefalopatia, acidose láctica e/ou RRF |
| MERRF | Mioclonia, epilepsia, ataxia cerebelar, fraqueza muscular, surdez, demência, RRF |
| NARP | Neuropatia periférica, ataxia, retinopatia pigmentar |
| Leber | Perda da visão central, telangiectasia peripapilar, microangiopatia |
| Mutações do DNAn | |
| Leigh | Encefalomiopatia necrotizante subaguda |
| MNGIE | Encefalomiopatia mitocondrial com distúrbio neuro-gastro-intestinal |

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

2.2 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 ou DNAn [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 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 PEO, menor porcentagem em pacientes com MELAS e MERRF, e estão ausentes em pacientes com síndrome de Leigh ou NARP [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 terapia 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: PEO, 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 nas doenças mitocondriais ocorre a segregação replicativa, o DNAm_t mutante é mais encontrado em tecidos com baixa capacidade de replicação. Dessa forma, a pesquisa das mutações tem obtido melhores resultados quando as amostras do DNAm_t pesquisadas são provenientes, por exemplo, de músculo estriado esquelético, células do epitélio urinário ou folículos capilares [FINSTERER, 2007; McDONNELL et al, 2004; SUE et al, 1998b]. Assim, a ausência de mutações do DNAm_t 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 [FINSTERER, 2007; McDONNELL et al, 2004; SUE et al, 1998b].

2.3 MERRF

2.3.1 Histórico

Os primeiros pacientes cuja manifestação clínica sugeria a síndrome de MERRF começaram a ser descritos a partir de 1973, onde os pacientes apresentavam doença mitocondrial cujo ponto comum era a presença de miopatia mitocondrial associada à epilepsia mioclônica familiar [TSAIRIS et al, 1973]. Nos anos seguintes outros casos com achados semelhantes foram

somados a literatura, e a partir deles em 1980, FUKUHARA et al, caracterizaram melhor os pacientes que possuíam mioclonia, epilepsia e disfunção mitocondrial na biópsia muscular (RRF), criando a denominação MERRF, do inglês *Myoclonus Epilepsy associated with Ragged-Red Fibers*, isto é, epilepsia mioclônica associada com fibras vermelhas rasgadas (RRF).

No Brasil, o primeiro relato de MERRF foi feito por ARRUDA et al, em 1990, ao descrever uma família em que três irmãos apresentavam epilepsia mioclônica associada com demência, ataxia cerebelar, fraqueza muscular e neuropatia sensitiva; na qual a investigação mostrou elevação do ácido láctico, eletroencefalograma (EEG) com resposta fotomioclônica, biópsia muscular com RRF e mitocôndrias anormais ao estudo por microscopia eletrônica, e dosagem da atividade das enzimas da cadeia respiratória compatível com deficiência de COX.

Outros dois importantes marcos históricos para medicina estão relacionados com MERRF, pois foi a primeira doença humana na qual o padrão de herança materno foi claramente demonstrado, sugerindo um defeito do DNAmT como responsável [ROSING et al, 1985]; e foi a primeira doença na qual um defeito molecular foi associado com uma forma específica de epilepsia [SHOFFNER et al, 1990; YONEDA et al, 1990].

2.3.2 Critérios diagnósticos

Na descrição de FUKUHARA et al., em 1980, os critérios diagnósticos de MERRF incluíam como manifestações da doença: mioclonia, epilepsia generalizada, ataxia cerebelar e RRF na biópsia muscular.

Os casos previamente publicados na literatura internacional, com diagnóstico sugestivo de MERRF, foram revisados por HIRANO & DiMAURO, em 1996, que confirmaram essas manifestações como as mais frequentes nesse grupo de pacientes com miopatia mitocondrial, reforçando a presença dessas alterações como critérios diagnósticos obrigatórios para a doença. Ainda, embora a principal manifestação desse grupo de pacientes com doença mitocondrial é a presença de mioclonia e epilepsia, outras alterações multissistêmicas podem ser encontradas: surdez, intolerância ao exercício, demência, neuropatia periférica, baixa estatura, alteração da condução cardíaca, cardiomiopatias, alteração da motilidade ocular, retinopatia pigmentar, lipoma, entre outras [HIRANO & DiMAURO, 1996; DiMAURO et al, 2002].

2.3.3 Correlação entre as alterações clínicas e a fisiopatológicas

Como nas demais doenças mitocondriais, a fisiopatologia está relacionada principalmente com a proporção de DNAm_t mutante (heteroplasmia), a distribuição do DNAm_t mutante em cada tecido e o limiar de vulnerabilidade de cada tecido à disfunção mitocondrial (falha da fosforilação oxidativa) [DiMAURO & HIRANO, 2009]. O grau de heteroplasmia e a distribuição do DNAm_t mutante nos diferentes tecidos tem justificado, em parte, a variação na apresentação clínica de pacientes com MERRF. No entanto, a seletiva vulnerabilidade de alguns tecidos em pacientes com MERRF ainda não foi elucidada [DiMAURO & HIRANO, 2009]. Como a fosforilação oxidativa está geneticamente prejudicada, as possíveis causas de vulnerabilidade desses neurônios provavelmente está relacionada com

desequilíbrio iônico intracelular (sódio/potássio/cálcio), utilização menos eficiente do oxigênio e síntese diminuída de trifosfato de adenosina (ATP) [JAMES et al, 1999; WU et al, 2010].

A correlação entre as alterações clínicas e a fisiopatologia em pacientes com MERRF não está completamente esclarecida, sendo consideradas duas principais hipóteses para explicar sua patogênese: (1) perda neuronal, a qual sugere que uma “citopatia mitocondrial” provocaria a falência energética de determinadas áreas do tecido cerebral causando a morte desses neurônios; e (2) hiperexcitabilidade neuronal, a qual sugere que um “distúrbio eletrolítico” provocaria alteração no potencial da membrana do neurônio causando mudança no padrão de excitabilidade neuronal e transmissão sináptica em determinadas áreas do tecido cerebral.

A hipótese de perda neuronal é baseada principalmente nos estudos histopatológicos que mostram perda neuronal e gliose em áreas específicas no cérebro, cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal [BERKOVIC et al, 1989; FUKUHARA, 1995]. A fosforilação oxidativa na mitocôndria é a responsável pela produção da maior parte da energia utilizada pelo neurônio na forma de ATP. A disponibilidade de ATP em situações de alta demanda energética esta geneticamente prejudicada em pacientes com MERRF [JAMES et al, 1999]. 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 [JAMES et al, 1999]. Como o neurônio tem alta demanda energética e baixa capacidade para reparo celular, ele é suscetível a morte frente à falta de energia para seu adequado

funcionamento [COCK & SCHAPIRA, 1999]. Dessa forma uma falha da fosforilação oxidativa na mitocôndria pode causar uma disfunção, e em algumas vezes até morte, do neurônio [COCK & SCHAPIRA, 1999]. Algumas das mutações do DNAm_t parecem causar essa falha da síntese de ATP em áreas consideradas potencialmente epileptogênicas do tecido cerebral [COCK & SCHAPIRA, 1999; KUNZ, 2002]. Como a mitocôndria é a responsável por fornecer a maior parte do ATP em neurônios, também participa na homeostase do cálcio intracelular e na formação de radicais livres, admite-se que ela pode estar intimamente envolvida com a perda de neurônios nessas áreas do tecido cerebral de pacientes com MERRF [COCK & SCHAPIRA, 1999; FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999; WU et al, 2010]. Nos pacientes com epilepsia por outras causas, como trauma, isquemia ou neoplasia do SNC, também foram encontradas mitocôndrias alteradas em áreas com atividade epileptogênica [KUNZ, 2002]. No entanto, o significado desse achado patológico permanece incerto, pois as alterações estruturais e funcionais, encontradas nas mitocôndrias dessas áreas, podem realmente ser relacionadas com a epileptogênese ou serem somente secundárias a morte neuronal. A produção de radicais livres na cadeia respiratória da mitocôndria também está sendo estudada como causa de perda neuronal em certas regiões potencialmente epileptogênicas [COCK & SCHAPIRA, 1999; FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; WU et al, 2010]. Embora exista grande variação na manifestação clínica das diversas doenças mitocondriais, a presença de alteração significativa no SNC, especialmente no córtex cerebral, é um achado frequente em todas as formas que cursam com epilepsia [COCK & SCHAPIRA, 1999; KUNZ, 2002]. Os estudos radiológicos do SNC confirmam que a

substância cinzenta esta precocemente alterada em pacientes com MERRF, enquanto que as alterações de substância branca ocorrem somente na fase tardia da doença e acompanhadas por alterações da substância cinzenta [BARKOVICH et al, 1993; COCK & SCHAPIRA, 1999; DiMAURO et al, 1999]. O envolvimento de outras partes do SNC, como o cerebelo, tronco cerebral e medula espinhal, também foi comprovado em pacientes com MERRF. O cerebelo mostra intensa perda neuronal, porém mais acentuada no núcleo denteado [BERKOVIC et al, 1989; BLUMENTHAL et al, 1998; FUKUHARA, 1995; SPARACO et al, 1993]. O núcleo olivar inferior é o mais acometido do tronco encefálico, seguido pelo núcleo rubro e pela substância negra [BERKOVIC et al, 1989; BLUMENTHAL et al, 1998; FUKUHARA, 1995; SPARACO et al, 1993]. Na medula espinhal, perda considerável ocorre na coluna posterior, mas a coluna anterior também podem estar acometida de forma menos intensa [BERKOVIC et al, 1989; BLUMENTHAL et al, 1998; FUKUHARA, 1995; SPARACO et al, 1993]. A degeneração do trato espinocerebelar posterior pode ser comumente encontrada nos pacientes com MERRF enquanto que o acometimento do trato corticoespinhal costuma ser menor [SPARACO et al, 1993; FUKUHARA, 1995]. A presença de desmielinização também pode ocorrer nesses pacientes afetando preferencialmente o pedúnculo cerebelar superior e os fascículos posteriores da medula espinhal [BLUMENTHAL et al, 1998; SPARACO et al, 1993]. As mutações do DNAm_t são consideradas relevantes para causar disfunção na fosforilação oxidativa somente quando a proporção de DNAm_t mutante atingir um determinado limiar, em relação ao DNAm_t normal, que costuma ser diferente para cada tecido [COCK & SCHAPIRA, 1999]. Embora estudos demonstrem que as mutações mais frequentes do DNAm_t de pacientes com

MERRF são encontradas em todo o cérebro, cerebelo e tronco cerebral, alguns estudos encontraram quantidades discretamente maiores de cópias do DNAm^t mutante nos núcleos olivar inferior, núcleo denteado, putamen, hipocampo e córtex cerebral [BRINCKMANN et al, 2010; SPARACO et al, 1995; TANNO et al, 1993]. O motivo pelo qual essas mutações preferem essas estruturas do tecido cerebral ainda permanece sem elucidação, mas esses achados colaboram para relacionar essas estruturas anatômicas com o aparecimento das manifestações clínicas em pacientes com MERRF. Contudo, somente os estudos histológicos não conseguem explicar o aparecimento das principais manifestações apresentadas pelos pacientes com MERRF.

Além da mitocôndria estar intimamente envolvida na morte do neurônio em áreas relacionadas com as vias epileptogênicas, outro importante papel da mitocôndria está relacionado com a hiperexcitabilidade neuronal. Os principais mecanismos pelo qual a disfunção mitocondrial pode causar atividade epileptiforme, por aumento da excitabilidade neuronal, são a diminuição do nível intracelular de ATP e as alterações na homeostase do cálcio do neurônio (Figura 1) [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; KILBRIDE et al, 2008]. A formação de ATP na mitocôndria é essencial tanto para a excitabilidade quanto para a própria sobrevivência do neurônio [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012]. Como descrito anteriormente, a fosforilação oxidativa produz a maior parte do ATP em neurônios e níveis adequados de ATP são essenciais para manter o potencial de membrana do neurônio, através do adequado funcionamento da bomba sódio/potássio ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase), que consome até 50% da energia para manter o potencial de membrana plasmática em adequada

condição de equilíbrio e funcionamento [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999]. Dessa forma, podemos admitir que o funcionamento inadequado da bomba Na^+/K^+ -ATPase, possivelmente causando um desequilíbrio iônico (sódio/potássio) devido a falta de ATP, poderia interferir no limiar do potencial da membrana plasmática dos neurônios [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999]. Essa alteração justificaria o aparecimento de algumas das manifestações clínicas mais frequentes encontradas em pacientes com MERRF: epilepsia e mioclonia. Ainda com relação à excitabilidade do neurônio, a quantidade e distribuição do cálcio intracelular do neurônio também exerce importante papel na manutenção do potencial de membrana plasmática do neurônio [BRINI et al, 1999; JAMES et al, 1999; KILBRIDE et al, 2008]. A mitocôndria tem um importante sistema de seqüestro de cálcio [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999; KILBRIDE et al, 2008]. A homeostase do cálcio intracelular também envolve a participação da bomba cálcio ATPase (Ca^{2+} -ATPase) retirando o cálcio intracelular e de receptores de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) introduzindo o cálcio no neurônio, o que confere capacidade de modular tanto a excitabilidade neuronal quanto a transmissão sináptica [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999; KILBRIDE et al, 2008]. Diante disso, existe a possibilidade que a mitocôndria defeituosa seja suficiente para causar distúrbio na homeostase intracelular do cálcio, o que pode estar relacionada com o aparecimento de epilepsia e mioclonia [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999; KILBRIDE et al, 2008]. Isso já foi demonstrado *in vitro* especialmente para a mutação T8356C de pacientes com MERRF [BRINI et al, 1999]. O aumento do cálcio dentro do neurônio também pode alterar de forma secundária a via do

glutamato, induzindo a maior liberação de glutamato na fenda sináptica, o que contribui para aumentar a excitabilidade do neurônio e modificar a transmissão sináptica [COCK & SCHAPIRA, 1999; FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999; KILBRIDE et al, 2008]. Essa mesma alteração do glutamato, provocando o aumento do cálcio intracelular pelo funcionamento excessivo dos receptores de glutamato (NMDA), também são implicados com o mecanismo de perda neuronal (excitotoxicidade pelo glutamato), pois altas concentrações de cálcio intracelular podem ativar proteases e fosfolipases dependentes de cálcio e produzir radicais livres tóxicos para o neurônio [COCK & SCHAPIRA, 1999; FOLBERGROVA & KUNZ, 2012; JAMES et al, 1999; KILBRIDE et al, 2008]. A perda de função da rede de neurônios inibitórios pelo defeito da fosforilação oxidativa também contribui para a hiperexcitabilidade neuronal [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012].

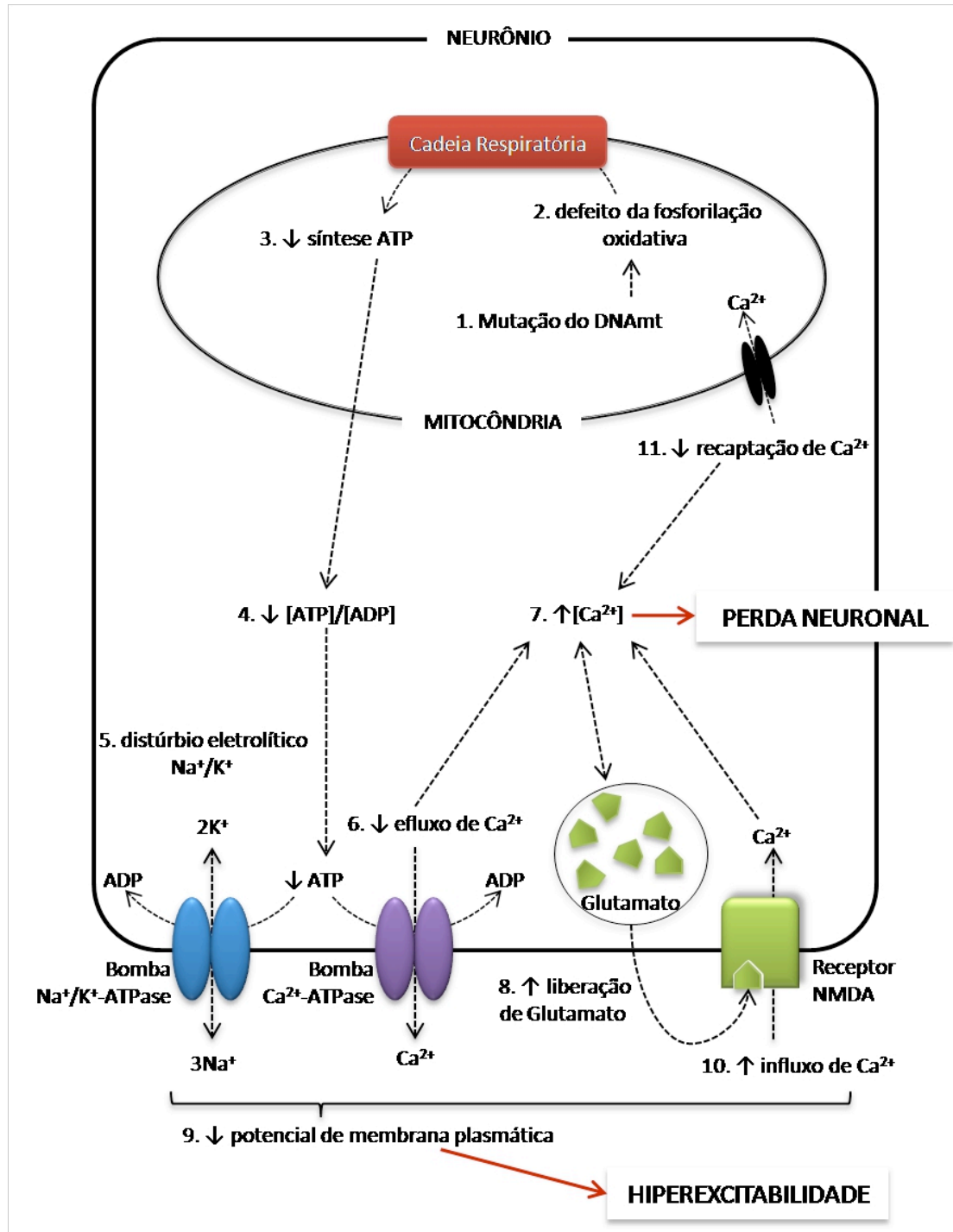


Figura 1. Representação esquemática dos possíveis mecanismos de perda neuronal e hiperexcitabilidade causados pela disfunção mitocondrial: Os defeitos da fosforilação oxidativa, causados por mutação do DNAmt, diminuem a síntese de ATP (1, 2 e 3). O neurônio com uma menor capacidade de manter o equilíbrio entre síntese e demanda de energia ($[\text{ATP}/\text{ADP}]$), para que a atividade iônica nos canais (bomba Na^+/K^+ -ATPase) da

membrana plasmática não seja comprometida, causa a diminuição do potencial de membrana plasmática (4, 5, 6 e 9). A diminuição da relação [ATP/ADP] também causa disfunção na bomba Ca^{2+} -ATPase, contribuindo para diminuir o potencial de membrana plasmática e levando ao acúmulo citoplasmático de cálcio (Ca^{2+}), o que pode levar a morte do neurônio (6 e 7). Os neurônios excitatórios quando despolarizados liberam glutamato e ativam os receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), causando influxo excessivo de Ca^{2+} através do canal, podendo levar a morte do neurônio (“excitotoxicidade por glutamato”) (7, 8 e 10). Ca^{2+} : cálcio; ADP: difosfato de adenosina; ATP: trifosfato de adenosina; DNAMt: DNA mitocondrial; K^+ : potássio; Na^+ : sódio; NMDA: N-metil-D-aspartato. [modificado de JAMES et al, 1999]

No entanto, nenhuma dessas hipóteses isoladamente consegue explicar de forma completa a ocorrência das principais manifestações da doença nos pacientes com MERRF, assim como em outras doenças mitocondriais. Dessa forma, os mecanismos que desencadeiam essas manifestações estão sendo correlacionados com uma combinação dessas hipóteses, onde tanto eventos de perda quanto de hiperexcitabilidade do neurônio, talvez ambos iniciados pela falha da fosforilação oxidativa em áreas específicas do tecido cerebral, podem ser os responsáveis pela patogênese das principais manifestações clínicas de pacientes com MERRF (Figura 2) [FOLBERGROVA & KUNZ, 2012].

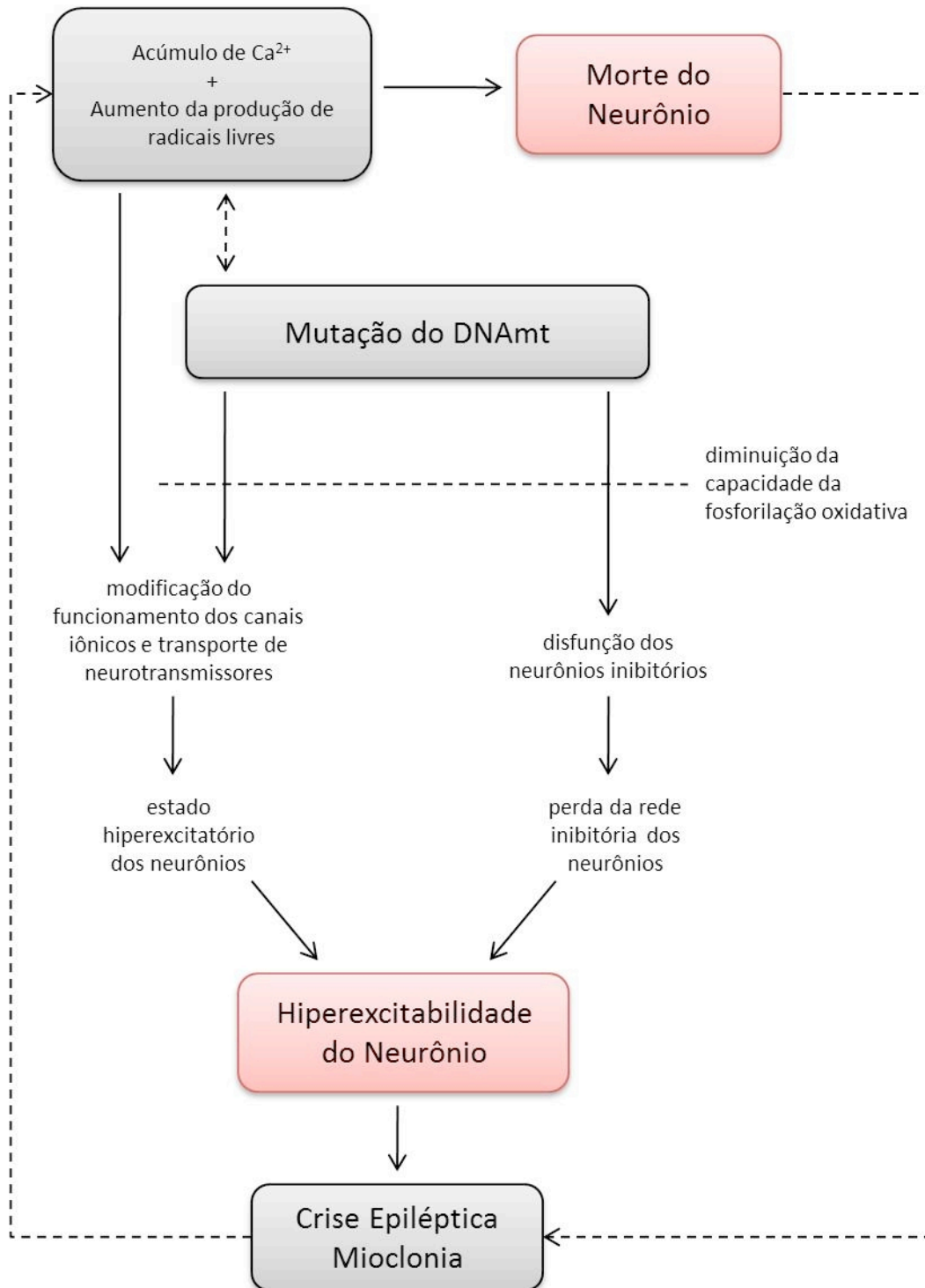


Figura 2. Mecanismo fisiopatológico proposto para explicar as principais manifestações clínicas de pacientes com MERRF. Ca^{2+} : cálcio; DNAm: DNA mitocondrial. [modificado de FOLBERGROVA & KUNZ, 2012]

Embora as mutações do gene do RNA transportador de lisina (tRNA^{Lys}) sejam freqüentemente descritas como causa de epilepsia, outras mutações do tRNA nos genes para fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, prolina, serina ou triptofano também estão associadas com o aparecimento de epilepsia [BLAKELY et al, 2009; CRIMMINS et al, 1993; HAHN et al, 2011; HERRERO-MATIN et al, 2010; MANCUSO et al, 2004; MARTÍN-JIMÉNEZ et al, 2012; MELONE et al, 2004; NAINI et al, 2005; NAKAMURA et al, 1995; SILVESTRI et al, 1992]. A presença de crises epilépticas do tipo clônica ou mioclônica com correlação eletroencefalográfica é maior na fase crônica da doença do que em sua fase inicial [CANAFIOLIA et al, 2001]. As crises epilépticas do tipo generalizadas são frequentemente observadas em diversas formas de epilepsia mioclônica, como MERRF, principalmente associadas com mutações nos genes tRNA^{Lys} e tRNA^{Ser} do DNAm; enquanto que as do tipo parcial são mais encontradas nas encefalopatias mitocondriais, como MELAS, associadas com mutações do gene tRNA^{Leu} [BERKOVIC et al, 1989; BERKOVIC et al, 1991; CANAFIOLIA et al, 2001; SHOFFNER et al, 1990; YONEDA et al, 1990]. Essas mutações geralmente afetam a síntese de proteínas nas subunidades de todos os complexos da cadeia respiratória que são codificados pelo DNAm. Dessa forma, parece que as mutações de ponto do DNAm estão mais relacionadas com a presença de epilepsia do que mutações do tipo rearranjo, justificando porque epilepsia é mais encontrada em pacientes com MERRF ou MELAS do que em pacientes com síndrome de Kearns-Sayre [KUNZ, 2002].

Essas evidências sugerem que o tipo de mutação do DNAm poderia influenciar o local de acometimento do SNC. Na síndrome de Kearns-Sayre a substância branca esta afetada principalmente no tronco cerebral, mas a

substância branca do cerebelo, cérebro, medula espinhal cervical e gânglios da base também é acometida [BARKOVICH et al, 1993; DiMAURO et al, 1999; FUKUHARA, 1995]. Em contraste, MELAS é caracterizado por focos de necrose localizados predominantemente no córtex cerebral e no hipocampo (uma região altamente epileptogênica), enquanto MERRF envolve de forma preferencial o núcleo olivar inferior, o núcleo denteado cerebelar, o núcleo rubro e a ponte, estruturas que estão relacionadas na gênese da mioclonia [BERKOVIC et al, 1989; BARKOVICH et al, 1993; DiMAURO et al, 1999; FUKUHARA, 1995].

As mioclonias apresentadas pelos pacientes com MERRF são clinicamente indistinguíveis daquelas apresentadas por pacientes com outras doenças (ritmo irregular e podendo aumentar com movimento ou estímulo), porém a sua patogênese ainda não foi completamente esclarecida. Isso provavelmente porque, assim como na maioria das doenças que causam mioclonia, existem múltiplas estruturas acometidas no SNC. Quanto ao tipo de mioclonia em relação a sua origem no sistema nervoso central, existem mais evidências que apontam para a ocorrência de mioclonia do tipo cortical do que para do tipo subcortical, embora ambas possam ocorrer nos pacientes com MERRF [BERKOVIC et al, 1989]. A lesão patológica responsável por causar mioclonia do tipo cortical não foi completamente elucidada, mas a perda de inibição intracortical (hiperexcitabilidade) parece ser o mecanismo responsável pelo seu aparecimento [SHIBASAKI & THOMPSON, 2011]. O fato da mioclonia do tipo cortical frequentemente estar associada a crises epilépticas, situação também denominada como epilepsia mioclônica progressiva, reforça a hipótese de hiperexcitabilidade cortical (córtex sensitivo, motor, ou ambos) como mecanismo patológico [SHIBASAKI, 2002]. O envolvimento seletivo dos

núcleos olivar inferior do tronco cerebral e denteado do cerebelo podem estar relacionados com o mecanismo responsável pelo aparecimento de mioclonia do tipo subcortical (reflexo reticular de mioclonia) em alguns desses pacientes, uma vez que ambos já foram implicados na formação desse tipo de mioclonia [BERKOVIC et al, 1989; CHUNG & VAN WOERT, 1984].

A presença de manifestação cerebelar, como ataxia, também é um importante achado em pacientes com MERRF; embora possa não estar presente na fase inicial da doença [BERKOVIC et al, 1989; OZAWA et al, 1995]. No entanto, as alterações clínicas e radiológicas de pacientes com MERRF são variadas podendo sugerir degeneração espinocerebelar, especialmente no início da doença [ITO et al, 2008]. Da mesma forma, atrofia do pedúnculo cerebelar superior e cerebelo, em adição as alterações do cérebro e gânglios da base, sugerem MERRF, especialmente em pacientes com dissociação entre a manifestação clínica com alteração cerebelar grave, e a manifestação radiológica com alteração leve [ITO et al, 2008].

Em outras doenças que apresentam epilepsia, mioclonia e ataxia, as estruturas afetadas do SNC são em locais semelhantes, embora que por mecanismos diferentes. Dessa forma, a revisão de alguns dos casos previamente diagnosticados como ataxia de Friedreich, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana ou síndrome de Ramsay-Hunt, tem encontrado como novo diagnóstico: MERRF [BERKOVIC et al, 1989; FUKUHARA, 1995; SO et al, 1989]. Casos com ataxia cerebelar, mioclonia e lipomas, inicialmente descritos por EKBOM, em 1975, também apresentam a mesma mutação do DNAm^t que é encontrada em pacientes com MERRF, sugerindo que o diagnóstico desses pacientes seja MERRF [BERKOVIC et al, 1989; TEIVE et al, 2008]. Isso reforça a

hipótese de que a perda neuronal tem importante papel na fisiopatologia dessas doenças. Além disso, essa semelhança clínica, e algumas vezes anatomopatológica, também coloca essas doenças no diagnóstico diferencial dos pacientes com MERRF.

Interessante destacar que a presença de alteração cerebelar também poderia justificar o aparecimento de mioclonia do tipo cortical em MERRF, uma vez que outras patologias que também envolvem o cerebelo, como hipóxia, degeneração espinocerebelar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, doença de Unverricht-Lundborg e atrofia de múltiplos sistemas, estão associadas com o aparecimento de mioclonia. A principal hipótese relacionada com esse fato seria que a perda de neurônios cerebelares (células de Purkinje, entre outras) poderia desencadear como reflexo um ganho na excitabilidade cortical, justificando o aparecimento de mioclonia e epilepsia nesses pacientes [BERKOVIC et al, 1989; BLUMENTHAL et al, 1998; FUKUHARA, 1995]. Além disso, o cérebro de pacientes com MERRF pode apresentar expressão diminuída de subunidades da cadeia respiratória, especialmente em sua região cortical [SPARACO et al, 1995]. Como discutido anteriormente, essa disfunção mitocondrial que ocorre no córtex cerebral poderia justificar uma perda de inibição intracortical (hiperexcitabilidade) suficiente para permitir manifestações como mioclonia e crises epilépticas, bem como as alterações cognitivas encontradas nesses pacientes.

As alterações cognitivas de pacientes com MERRF geralmente são de grau leve e longa evolução, diferente de pacientes com outras doenças mitocondriais, como MELAS, que apresentam maior alteração cognitiva [BERKOVIC et al, 1989; DiMAURO et al, 2002; ZEVIANI et al, 1991].

A proporção de DNAm^t mutante nos diferentes tecidos acometidos parece ser semelhante em pacientes com MERRF, variando de 50% até 99% quando associado a mutações do tRNA^{Lys} tanto em tecidos clinicamente afetados quanto nos não afetados, sugerindo que as manifestações clínicas não podem ser explicadas somente pela variação de distribuição do DNAm^t mutante em diferentes tecidos, mas também outros fatores devem estar envolvidos nesse processo [BOULET et al, 1992; HAMMANS et al, 1993; LARSSON et al, 1995; OZAWA et al, 1997; TANNO et al, 1993; VIRGILIO et al, 2009]. Isso permite que o DNAm^t usado para o estudo molecular de pacientes com MERRF possa ser extraído de leucócitos do sangue periférico, encontrando resultados semelhantes aqueles com DNAm^t extraído de músculo, tornando mais fácil a identificação desses pacientes. Mesmo assim, existem tecidos de pacientes com MERRF em que o grau de heteroplasmia é diferente, como nos lipomas, onde a heteroplasmia mutante costuma ser maior do que nos leucócitos de sangue periférico, no músculo ou no tecido adiposo subcutâneo [HOME et al, 1993; LARSSON et al, 1995; TRAFF et al, 1995; VILA et al, 2000]. Ainda, embora não exista essa diferença na quantidade de DNAm^t mutante entre os diversos tecidos, em pacientes com MERRF foi encontrada correlação entre a quantidade de DNAm^t mutante e a gravidade da doença, ou seja, pacientes com DNAm^t mutante em grande quantidade (mais de 90%) apresentam maior acometimento enquanto os com pequena quantidade (menos de 60%) apresentam menor envolvimento [HAMMANS et al, 1993; VIRGILIO et al, 2009].

Como mencionado anteriormente, MERRF envolve preferencialmente o núcleo olivar inferior, o núcleo denteado cerebelar, o núcleo rubro e a ponte, assim como a substância cinzenta costuma apresentar mais alteração

do que a substância branca [BERKOVIC et al, 1989; DiMAURO et al, 1999; FUKUHARA, 1995]. Os estudos radiológicos convencionais de crânio, como tomografia computadorizada ou imagem por ressonância magnética (IRM), tem confirmado que a substância cinzenta esta precocemente alterada em pacientes com MERRF, enquanto que alteração na substância branca também pode ser vista, porém na fase tardia da doença e nunca de forma isolada [BARKOVICH et al, 1993; DiMAURO et al, 1999]. A atrofia cerebral, cerebelar e de tronco cerebral ocorre como conseqüência da progressiva perda neuronal [DiMAURO et al, 2002; ITO et al, 2008; ORCESI et al, 2006]. Dessa forma, espera-se encontrar nos pacientes com MERRF freqüentemente atrofia cortical, predominando em cérebro e cerebelo, e discretas alterações em núcleo olivar inferior, núcleo denteado cerebelar, núcleo rubro e a ponte.

O envolvimento cardíaco pode ocorrer em pacientes com MERRF, 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 [DiMAURO et al, 2002; OZAWA et al, 1995; WAHBI et al, 2010]. As alterações cardíacas não são as principais manifestações clínicas da doença, embora a presença de miocardiopatia, com disfunção ventricular esquerda, foi associada com maior mortalidade devido a insuficiência cardíaca [DiMAURO et al, 2002; OZAWA et al, 1995; WAHBI et al, 2010]. A presença da mutação G8363A foi associada com a presença de miocardiopatia em pacientes com MERRF [OZAWA et al, 1997; SANTORELLI et al, 1996; VIRGILIO et al, 2009].

A perda auditiva, ou surdez, é uma característica bem reconhecida das doenças que acometem o DNAmt. Assim, pacientes com mutação de ponto como A1555G ou A3243G estão mais suscetíveis a perda auditiva, sendo sua gravidade relacionada com a porcentagem do DNAmt 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, 1998a]. 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 DNAmt [CHINNERY et al, 2000; KARKOS et al, 2004; SUE et al, 1998a].

Como nas demais doenças mitocondriais, não existe um tratamento específico para MERRF [DiMAURO et al, 2002; SHAHWAN et al, 2005]. No entanto, o tratamento sintomático inclui o uso de medicação anti-epiléptica para controle da mioclonia e da epilepsia [DiMAURO et al, 2002; SHAHWAN et al, 2005]. A mioclonia freqüentemente é refratária ao tratamento convencional, mas clonazepam e zonisamida podem ser usados nesses pacientes [DiMAURO et al, 2002]. Embora o ácido valpróico seja considerado uma das medicações de primeira escolha na epilepsia mioclônica progressiva, o tratamento de pacientes com MERRF é geralmente empírico [SHAHWAN et al, 2005]. Contudo, importante lembrar que o ácido valpróico provoca inibição da captação de

carnitina e deve ser utilizado com cuidado ao tratar pacientes com MERRF, para evitar o agravamento da sua disfunção mitocondrial, e sempre que possível combinado com suplementação de L-carnitina [DiMAURO et al, 2002; SHAHWAN et al, 2005].

2.3.4 Genética mitocondrial

Em 1990, SHOFFNER et al e YONEDA et al, descreveram uma mutação de ponto do DNAm_t afetando o gene que codifica o RNA transportador de lisina (tRNA^{Lys}) na posição 8344 pela troca do nucleotídeo A por G (A8344G) no músculo de pacientes com MERRF. O gene mitocondrial tRNA^{Lys}, também conhecido como *MT-TK* ou *TRNK*, está localizado entre os nucleotídeos 8295 e 8364 do DNAm_t, sendo responsável pela decodificação dos códons AAR (R = A ou G) [YASUKAWA et al, 2005]. A mutação A8344G pode causar a terminação prematura da tradução do códon da lisina, de forma mais acentuada do que outras mutações no mesmo gene, causando uma deficiência na capacidade de aminoacilação do tRNA^{Lys} [ENRIQUEZ et al, 1995]. Embora alguns estudos demonstrem que a capacidade de aminoacilação do tRNA^{Lys} de pacientes com MERRF pela mutação A8344G não esteja tão alterada quanto a de pacientes com MELAS pela mutação A3243G do tRNA^{Leu(UUR)} [BORNER et al, 2000]. Isso poderia levar a redução do nível funcional de tRNA^{Lys} que participa do processo de síntese de proteína mitocondrial [ENRIQUEZ et al, 1995]. Após essa primeira descrição outros estudos demonstraram que a mutação A8344G era responsável pela maioria dos casos de MERRF [BERKOVIC et al, 1991; HAMMANS et al, 1991].

Nos anos seguintes a descoberta da mutação A8344G, três outras mutações de ponto também foram encontradas em pacientes com MERRF no gene do tRNA^{Lys} do DNAm: a substituição do nucleotídeo T por C na posição 8356 (T8356C), a substituição do nucleotídeo G por A na posição 8361 (G8361A) e a substituição do nucleotídeo G por A na posição 8363 (G8363A) [ROSSMANITH et al, 2003; SANTORELLI et al, 1996; SILVESTRI et al, 1992]. Contudo, outros estudos continuaram demonstrando que a mutação A8344G ainda era responsável pela maioria dos casos de MERRF [BERKOVIC et al, 1991; DIMAURO et al, 2002; HAMMANS et al, 1991; HIRANO & DIMAURO, 1996; OZAWA et al, 1997; SEIBEL et al, 1991; SHIH et al, 1991; TANNO et al, 1991; ZEVIANI et al, 1991].

A mutação de ponto T8356C foi encontrada em pacientes com MERRF que também apresentavam episódios semelhantes a acidente vascular cerebral isquêmico, sugerindo uma sobreposição entre as doenças mitocondriais MERRF e MELAS [SILVESTRI et al, 1992; ZEVIANI et al, 1993]. A mutação de ponto A8361G foi descrita associada com surdez e demência [ROSSMANITH et al, 2003]. A mutação de ponto G8363A parece estar relacionada com a presença de miocardiopatia e surdez em pacientes com MERRF bem como em alguns casos com sobreposição com a síndrome de Leigh [OZAWA et al, 1997; SANTORELLI et al, 1996; SHTILBANS et al, 2000; VIRGILIO et al, 2009].

Mutações em outros genes do DNAm foram raramente associadas com MERRF [BLAKELY et al, 2009; CRIMMINS et al, 1993; HAHN et al, 2011; HERRERO-MATIN et al, 2010; MANCUSO et al, 2004; MARTÍN-JIMÉNEZ et al, 2012; MELONE et al, 2004; NAINI et al, 2005; NAKAMURA et al, 1995; SILVESTRI et al, 1992]. Em raros casos, a mutação de ponto pela substituição do nucleotídeo A por G na posição 3243 (A3243G) no gene *MT-TL1* que codifica o RNA

transportador de leucina (UUR) ($\text{tRNA}^{\text{Leu(UUR)}}$), que é a mutação mais frequente em pacientes com MELAS, foi descrita causando manifestação clínica típica de MERRF, bem como em pacientes com MERRF que também apresentavam episódios semelhantes a acidente vascular cerebral isquêmico [BRACKMANN et al, 2012; CRIMMIMS et al, 1993; FABRIZI et al, 1996; FOLGERO et al, 1995]. Outras mutações de ponto também foram descritas causando MERRF associado a MELAS, sugerindo mais uma vez uma sobreposição entre as doenças mitocondriais MERRF e MELAS [HERRERO-MARTINS et al, 2010; MELONE et al, 2004; NAINI et al, 2005; NAKAMURA et al, 1995; SILVESTRI et al, 1992].

No decorrer dos anos, poucas mutações de ponto no DNAm_t foram encontradas em pacientes com MERRF sendo geralmente no gene do tRNA^{Lys} do DNAm_t ou associadas com sobreposição com outras doenças mitocondriais (Tabela 2). Dessa forma, estima-se que a mutação A8344G permanece responsável por mais de 80% dos pacientes com MERRF, as mutações T8356C, G8361A e G8363A por aproximadamente 10% e as demais mutações por menos de 5% dos casos, porém até 10% dos pacientes com MERRF ainda persistem sem identificação de mutação no DNAm_t [BRACKMANN et al, 2012; DIMAURO & HIRANO, 2009; FUKUHARA, 1995; HAMMANS et al, 1991; SHOFFNER & WALLACE, 1992].

A presença de mutação por rearranjo do tipo deleção no DNAm_t foi raramente descrita associada com fenótipo de MERRF [BLUMENTHAL et al, 1998]. Da mesma forma, a presença de mutação missense recessiva do DNA nuclear (DNAn) no gene da polimerase gama (*POLG*), a polimerase envolvida na replicação do DNAm_t, foi descrita em homozigose somente em um paciente com fenótipo de MERRF associado a neuropatia sensitiva [VAN GOETHEM et al, 2003].

A avaliação clínica e laboratorial tem encontrado familiares acometidos de forma incompleta para MERRF, geralmente com padrão de herança materna, e o estudo genético tem mostrado que mesmo familiares maternos clinicamente assintomáticos, mas com mutação A8344G, também podem ter disfunção mitocondrial com presença de RRF na biópsia muscular [BORNER et al, 2000; KAZACOS et al, 2012; ZEVIANI et al, 1991]. Dessa forma, a mutação A8344G parece ser específica para os pacientes com MERRF, uma vez que foi raramente descrita em outras doenças mitocondriais sem a presença de epilepsia ou mioclonia [KAZACOS et al, 2012; ZEVIANI et al, 1991]. Ainda, pacientes com MERRF concomitante com outras doenças mitocondriais como MELAS, síndrome de Leigh, síndrome de Kearns-Sayre, NARP, neuropatia, surdez e retinopatia pigmentar tem sido relatados associados a outras mutações do DNAm diferentes da A8344G [BLAKELY et al, 2009; CRIMMINS et al, 1993; EMMANUELE et al, 2011; HERRERO-MARTINS et al, 2010; MARTIN-JIMENEZ et al, 2012; MELONE et al, 2004; NAINI et al, 2005; NAKAMURA et al, 1995; NISHIGAKI et al, 2003; ROSSMANITH et al, 2003; SANTORELLI et al, 1996; SILVESTRI et al, 1992; VAN GOETHEM et al, 2003]. Esses dados contribuem para afirmar que embora as doenças mitocondriais causadas por mutação de ponto do DNAm possuem fenótipo heterogêneo, no caso das causadas pela mutação de ponto A8344G o fenótipo geralmente resulta em MERRF.

Tabela 2. Mutações associadas com fenótipo de MERRF.

| Mutação | Gene | Referência |
|---------------------------------|----------------------|--|
| do DNAMt tipo ponto: | | |
| nt-611 (G>A) | <i>tRNA-Phe</i> | Mancuso et al. (2004) |
| nt-3243 (A>G) | <i>tRNA-Leu(UUR)</i> | Crimmins et al. (1993) ³ |
| nt-3255 (G>A) | <i>tRNA-Leu(UUR)</i> | Nishigaki et al. (2003) ⁷ |
| nt-3291 (T>C) | <i>tRNA-Leu(UUR)</i> | Emmanuele et al. (2011) ⁷ |
| nt-4284 (G>A) | <i>tRNA-Ile</i> | Hahn et al. (2011) |
| nt-5521 (G>A) | <i>tRNA-Trp</i> | Herrero-Martín et al. (2010) ³ |
| nt-7512 (T>C) | <i>tRNA-Ser(UCN)</i> | Nakamura et al. (1995) ³ |
| nt-8344 (A>G) | <i>tRNA-Lys</i> | Shoffner et al. (1990) Yoneda et al. (1990) |
| nt-8356 (T>C) | <i>tRNA-Lys</i> | Silvestri et al. (1992) ³ |
| nt-8361 (G>A) | <i>tRNA-Lys</i> | Rossmannith et al. (2003) ⁶ |
| nt-8363 (G>A) | <i>tRNA-Lys</i> | Santorelli et al. (1996) ⁴ |
| nt-12147 (G>A) | <i>tRNA-His</i> | Melone et al. (2004) ³ |
| nt-12300 (G>A) | <i>tRNA-Leu(CUN)</i> | Martín-Jiménez et al. (2012) ² |
| nt-13042 (A>T) | <i>ND5</i> | Naini et al. (2005) ³ |
| nt-15967 (G>A) | <i>tRNA-Pro</i> | Blakely et al. (2009) ⁵ |
| do DNAMt tipo rearranjo: | | |
| deleção múltipla | - | Blumenthal et al. (1998) ¹ |
| do DNAn tipo missense: | | |
| deleção múltipla | <i>POLG</i> | Van Goethem et al. (2003) ¹ |

Fenótipo de MERRF concomitante com: ¹: neuropatia sensitiva; ²: NARP; ³: MELAS; ⁴: síndrome de Leigh, miocardiopatia e surdez; ⁵: surdez e retinopatia; ⁶: surdez e demência; ⁷: síndrome de Kearns-Sayre.

2.3.5 Alterações laboratoriais e bioquímicas

O nível do ácido láctico no sangue e no líquido cefalorraquiano (LCR) está elevado ao repouso e pode aumentar moderadamente após os esforços físicos em pacientes com MERRF [DiMAURO et al, 2002; OZAWA et al, 1995]. O nível sérico elevado de ácido láctico pode ser encontrado em familiares assintomáticos de pacientes com MERRF [ZEVIANI et al, 1991]. O nível do ácido láctico cerebral, medido pela espectroscopia, costuma estar aumentado na

maioria dos pacientes com MERRF, e em seus familiares, porém em níveis menores do que encontrado em pacientes com MELAS [DiMAURO et al, 2002]. Outros exames podem ser usados na investigação, como dosagens de creatina quinase (CK), porém seus resultados são inespecíficos para MERRF, 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 auxiliando a demonstrar o acometimento muscular nesses pacientes [GOTO et al, 1992; FINSTERER, 2009]. O nível de proteína no LCR pode estar elevado, mas geralmente não ultrapassa 100 mg/dl [DiMAURO et al, 2002].

Os estudos bioquímicos mostram que diversos complexos podem estar deficientes de forma isolada ou combinada, mas os complexos I e IV parecem ser os mais envolvidos da cadeia respiratória em pacientes com MERRF, geralmente associado com alterações de outros complexos da cadeia respiratória, enquanto que o complexo II parece ser o menos afetado. [BERKOVIC et al, 1989; BINDOFF et al, 1991; BOULET et al, 1992; COQUET et al, 1993; OZAWA et al, 1995; SHOFFNER et al, 1990; WALLACE et al, 1988b]. A quantidade de fibras musculares com atividade deficiente da COX na biópsia muscular de pacientes com MERRF também sugerem que o complexo IV da cadeia respiratória pode ser um dos mais envolvidos nesses pacientes [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; MANCUSO et al, 2007; PAEPE et al, 2009]. Isso pode ser observado também pelo fato de pacientes com MERRF, que possuem a mutação de ponto A8344G apresentarem frequência elevada de fibras musculares, RRF e não RRF, com deficiência de atividade da COX na

biópsia muscular, em contraste aos pacientes com MELAS, com a mutação de ponto A3243G, que apresentam grande incidência de fibras RRF com reação histoquímica normal para COX [BOULET et al, 1992; BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; LORENZONI et al, 2009]. O complexo II parece ser o menos acometido em pacientes com MERRF, possivelmente por ser codificado pelo DNAn. A dosagem bioquímica dos complexos da cadeia respiratória pode estar normal em alguns casos [BERKOVIC et al, 1989; OZAWA et al, 1995].

2.3.6 Alterações eletrofisiológicas

O EEG de pacientes com MERRF usualmente apresenta variação no grau de alentecimento da atividade de fundo e atividade epileptiforme generalizada que pode aumentar com o estímulo fótico intermitente [CANAFOLIA et al, 2001; OZAWA et al, 1995; SHAHWAN et al, 2005; SINHA et al, 2007; SO et al, 1989]. Epilepsia pode ser observada em outras doenças mitocondriais, e conseqüentemente, pacientes com outras doenças mitocondriais podem apresentar alterações no EEG semelhantes ao dos pacientes com MERRF [CANAFOLIA et al, 2001]. Contudo, pacientes com MERRF tem menos sinais focais ao EEG do que ocorre em MELAS ou na síndrome de Leigh [CANAFOLIA et al, 2001; SO et al, 1989]. Por outro lado, o EEG revela anormalidades nos pacientes com MERRF muito semelhantes aquelas encontradas em outras epilepsias mioclônicas progressivas [SHAHWAN et al, 2005; SINHA et al, 2007; SO et al, 1989]. Também, resposta foto sensitiva ao EEG pode ser observada tanto em pacientes com MERRF quanto em pacientes com outras miopatias mitocondriais, como MELAS ou síndrome de Leigh, e

com as sobreposição dessas doenças [CANAFOLIA et al, 2001; SINHA et al, 2007]. A resposta foto sensitiva foi ocasionalmente descrita desencadeando crise epiléptica em pacientes com MERRF [SO et al, 1989]. MERRF deve ser considerada no diagnóstico diferencial das epilepsias mioclônicas progressivas, incluindo a doença de Lafora, neurolipofuscinose, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana e doença de Unverricht-Lundborg [SHAHWAN et al, 2005; SINHA et al, 2007; SO et al, 1989].

A eletromiografia de agulha nos pacientes com MERRF é consistente com processo miopático e o estudo da condução nervosa pode demonstrar alterações compatíveis com neuropatia, podendo coexistir miopatia e neuropatia em alguns dos pacientes. A presença de alterações na fibra muscular na eletromiografia de agulha pode ocorrer em cerca de 50% dos pacientes com MERRF [OZAWA et al, 1995]. O tipo de alteração na eletromiografia de agulha pode variar dependendo do momento em que o exame é realizado e da gravidade da doença, sendo possível encontrar nesses pacientes um músculo miopático, desenergizado ou misto (miopático e desenergizado) [OZAWA et al, 1995]. Nos casos com neuropatia, o padrão encontrado na maioria dos pacientes é de neuropatia axonal sensitiva e motora [DiMAURO et al, 2002; SINHA et al, 2007; SO et al, 1989].

2.3.7 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 MERRF

apresentam RRF no decorrer da evolução, sendo que sua frequência costuma ser maior na reação histoquímica para SDH do que na coloração pelo TGM, semelhante ao que ocorre em outras doenças mitocondriais [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; GOTO, 1995; GOTO et al, 1992]. A ausência de RRF pode raramente ser observada na biópsia muscular de pacientes com MERRF [BERKOVIC et al, 1989; FUKUHARA, 1995; MANCUSO et al, 2007; OZAWA et al, 1997]. O grau de heteroplasmia (proporção de DNAm_t normal e mutante em cada tecido) também é um fator importante influenciando a variabilidade dos achados da biópsia muscular [OZAWA et al, 1995; OZAWA et al, 1997].

Entretanto, as duas alterações morfológicas na biópsia muscular que ajudam a distinguir MERRF das demais doenças mitocondriais são: (1) a grande proporção de fibras musculares (RRF e não RRF) que tem atividade deficiente da COX; e (2) a presença de vasos com reação aumentada para SDH e deficiência da COX [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; MANCUSO et al, 2007; PAEPE et al, 2009]. 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 [MITA et al, 1998; NISHIGAKI et al, 2003; OZAWA et al, 1995; OZAWA et al, 1997]. 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 MERRF, semelhante ao que ocorre em outras doenças mitocondriais, como a MELAS e PEO [MATSUOKA et al, 1991]. Dessa forma, podem ocorrer numa mesma fibra muscular porções COX positivas e COX negativas sem limites bem demarcados entre essas

diferentes porções [MATSUOKA et al, 1991; 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 A8344G ou G8363A [OZAWA et al, 1997]. Como mencionado anteriormente, a presença de fibras COX- nos pacientes com MERRF é maior do que a encontrada em outras doenças mitocondriais, como MELAS, demonstrando que as diferentes mutações do DNAm_t podem influenciar nos achados histológicos das diferentes doenças mitocondriais [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; GOTO, 1995; GOTO et al, 1992; LORENZONI et al, 2009; MANCUSO et al, 2007; PAEPE et al, 2009].

Os estudos por microscopia eletrônica mostram que a presença de alterações na mitocôndria em outros tecidos, principalmente no cérebro e cerebelo, também podem ocorrer em pacientes com MERRF [FUKUHARA, 1995].

A presença de vasos na biópsia muscular, usualmente arteríolas, com reação aumentada para SDH (SDH+) é um achado frequente em pacientes com MELAS ou MERRF, mas raramente encontrado em pacientes com PEO [GOTO, 1995; GOTO et al, 1992; HASEGAWA et al, 1991; HASEGAWA et al, 1993]. Na microscopia eletrônica foi observado que esses vasos contêm mitocôndrias aumentadas em número e tamanho, sendo compatível com doença mitocondrial [COQUET et al, 1993]. Os vasos SDH+ encontrados em pacientes com MERRF também apresentam deficiência de COX, diferente do que ocorre em MELAS, sugerindo que nesses pacientes a deficiência de COX

tem maior relevância na fisiopatologia da doença [COQUET et al, 1993; HASEGAWA et al, 1993]. A presença de vasos com reação aumentada para SDH também foi descrita em pacientes com manifestação típica de MERRF associada com a mutação mais frequente de MELAS, A3243G, indicando que a presença dessa alteração histológica pode sugerir sobreposição dessas doenças [FABRIZI et al, 1996].

Esse tipo de envolvimento vascular em pacientes com MERRF ainda não tem seu significado patogênico totalmente conhecido, contudo, alguns investigadores ainda acreditam que essa alteração nos vasos sanguíneos pode indicar que MERRF também tem uma angiopatia sistêmica envolvida em sua fisiopatologia [COQUET et al, 1993]. Outra 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]. Embora essa mesma importância ainda não tenha sido estabelecida em pacientes com MERRF, já existe descrição de paciente com MERRF, pela mutação G8363A, com biópsia muscular apresentando vasos com reação aumentada para SDH na ausência de RRF [OZAWA et al, 1997].

Dessa forma, a biópsia muscular de pacientes com MERRF, especialmente aqueles com a mutação A8344G, costuma ter vasos com reação aumentada para SDH e deficiência da COX, bem como fibras musculares RRF e não RRF com atividade deficiente da COX [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; HASEGAWA et al, 1993].

3 OBJETIVOS

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

- 3.1 Caracterizar as manifestações clínicas, laboratoriais, eletrofisiológicas e morfológicas; e
- 3.2 Determinar a frequência das mutações do gene tRNA^{Lys} do DNAm.

4 MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro de 2001 até janeiro de 2011, foram realizadas 1282 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 MERRF, de acordo com os seguintes critérios diagnósticos obrigatórios para inclusão dos pacientes no estudo [FUKUHARA et al, 1980; FUKUHARA, 1995; HIRANO & DiMAURO, 1996]: (1) mioclonia; (2) epilepsia generalizada; e (3) evidência de disfunção mitocondrial caracterizada pela presença de qualquer quantidade de fibras vermelhas rasgadas (RRF) na biópsia muscular.

Do total dos pacientes analisados, a suspeita diagnóstica de MERRF foi feita em 10 pacientes por estes critérios, mas 4 pacientes foram excluídos deste estudo por apresentarem falta de evidência morfológica de disfunção mitocondrial na biópsia muscular.

Nos seis pacientes que possuíam todos os critérios de inclusão foram pesquisados os dados relacionados com: avaliação clínica, exame laboratorial, exame de eletroneuromiografia, eletrocardiograma, eletroencefalograma, estudo neurorradiológico, biópsia muscular e estudo molecular do DNAMt.

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os dados clínicos como idade, sexo, manifestações clínicas, tratamento antiepiléptico 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 início da mioclonia ou epilepsia 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. A resposta ao tratamento antiepiléptico foi classificada como presente, ausente ou parcial baseada na melhora objetiva da mioclonia e epilepsia durante o tratamento.

4.2 EXAME LABORATORIAL

O nível sérico da enzima muscular CK foi considerado normal quando o resultado variou entre 29 e 129 U/L, sendo elevado quando o valor estava acima ou igual a 130 U/L.

O nível sérico do ácido láctico foi considerado normal com resultados de até 22 mg/dl, sendo considerado aumentado quando o valor estava acima ou igual a 22,1 mg/dl.

O nível de proteína no LCR foi classificado como normal quando encontrado até 45 mg/dl ou elevado quando acima de 45,1 mg/dl.

4.3 ELETROCARDIOGRAMA

As alterações eletrocardiográficas foram analisadas e descritas conforme procedimento de rotina utilizado pelo Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná [MARQUETTI, 2013].

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 ELETROENCEFALOGRAMA

O exame de EEG foi realizado no sistema de montagem 10-20, conforme as técnicas de rotina utilizadas pelo Serviço de Eletroencefalografia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sendo descritas a presença de alterações no EEG interictal relacionadas com: atividade de

fundo (normal ou lenta), descargas epileptiformes (ausente, parcial ou generalizada) e resposta a fotoestimulação intermitente (fotossensível ou não fotossensível).

4.6 ESTUDO NEURORRADIOLÓGICO

A presença de alterações foi observada a partir dos exames de tomografia computadorizada ou imagem por ressonância magnética (IRM) de crânio realizadas pelos pacientes durante sua investigação diagnóstica.

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 foi feita 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 pesquisadas 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 frequência 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 do DNAm^t foi realizada a partir de músculo por uma combinação de técnicas (PCR/RFLP e sequenciamento direto) para a pesquisa das mutações descritas na literatura como freqüentes, bem como, para novas mutações no gene tRNA^{Lys} do DNAm^t em pacientes com MERRF.

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 de músculo por Fenol – Clorofórmio [SAMBROOK, 1989] modificada, mostrou-se adequada para essa amostra, com as quantidades de DNA total obtidas descritas na tabela 11 (Apêndice).

4.8.2 Identificação das mutações no DNAm^t

A pesquisa das mutações de ponto A8344G e A3243G do DNAm^t foram realizadas por PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição), enquanto, na ausência da mutação A8344G foi realizado o seqüenciamento para pesquisa de outras mutações no gene tRNA^{Lys} do DNAm^t.

4.8.2.1 Estudo molecular da mutação na posição 8344 do DNAm^t

Na pesquisa da mutação A8344G (troca da base adenina pela guanina no nucleotídeo 8344 no gene tRNA^{Lys} do DNAm^t), a amplificação do fragmento foi realizada para uma solução final de 25 μ l com: 50pmol do oligonucleotídeos 8344-S (nt 8273-8305: 5' – CCCCTCTACCCCCTCTAGAGCCCCTGTAAAGC – 3'), 50pmol do oligonucleotídeo 8344-AS (nt 8372-8345): 5' – GGGGCATTTCACTGTAAAGAGGTGTGGG – 3'), 200 μ M de cada dNTP (A,T,C,G), 2,5 μ l de solução tampão 1X (500 mM KCl + 200 mM Tris-HCl pH 8,4), 2,0 mM de MgCl₂ e 2,5 μ l de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O oligonucleotídeo 8344-AS apresenta uma troca de base no nt 8347 (T por G) que, juntamente com a troca da base no nt 8344 (A por G) do DNAm^t mutante, cria um sítio adicional de clivagem da enzima *Ban*II nos fragmentos amplificados provenientes do DNAm^t mutante, mas não do DNAm^t normal. 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 99 pb será digerido com a enzima de restrição BanII (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 16 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]. 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 A pela G na posição 8344. Dessa forma, a digestão do produto de PCR com essa enzima de restrição forneceu dois fragmentos (78 e 21 pb) no DNAm^t normal, enquanto que no paciente com mutação, um dos fragmentos (78 pb) é dividido em dois (52 e 26 pb), resultando em quatro fragmentos (78, 52, 26 e 21 pb).

4.8.2.2 Estudo molecular da mutação na posição 3243 do DNAm^t

Na pesquisa da mutação A3243G (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 µl: 50pmol do oligonucleotídeo 3243-S (nt 3116-3134: 5' - CCTCCCTGTACGAAAGGAC - 3'), 50pmol do oligonucleotídeo 3243-AS (nt 3353-3333: 5' - GCGATTAGAATGGGTACAATG - 3'), 200 µM de cada dNTP (A,T,C,G), 2,5 µL 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 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) [LORENZONI et al, 2009].

4.8.2.3 Sequenciamento do gene tRNA^{Lys} do DNAm

Na pesquisa de mutações através do sequenciamento, foi realizado PCR com a amplificação do fragmento localizado entre os nucleotídeos 8295 e 8364, que contém um fragmento do gene tRNA^{Lys} do DNAm, utilizando para uma solução final de 25 µl: 50pmol do oligonucleotídeo 8344-S (nt 8273-8305: 5' – CCCCTCTACCCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC – 3'), 50pmol do oligonucleotídeo 8993-AS (nt 9950-9931: 5' -

AACCACATCTACAAAATGCC - 3'), 200 μ M de cada dNTP (A,T,C,G), 2,5 μ L 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 sequenciamento 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 8344-S, e 2ul 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 centrifugação (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 sequências obtidas foram comparadas a seqüência do DNAm normal na pesquisa das mutações previamente descritas como associadas ao fenótipo de MERRF, bem como, para pesquisa de possíveis mutações novas desse gene [ANDERSON et al, 1981].

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A amostra consiste de 6 pacientes, sendo 2 do sexo feminino e 4 do masculino, com idade entre 27 e 54 anos. O desenvolvimento motor foi normal em todos os pacientes. O tempo de progressão da doença variou de 2 até 15 anos (tempo médio de 92 meses). Todos os pacientes apresentam história de familiar com a mesma manifestação clínica e três dos pacientes (casos 2, 4 e 6) pertencem à mesma família (Figura 3).

Todos os pacientes apresentavam mioclonia e crise epiléptica com idade de início variando de 15 a 40 anos (tempo médio de 28,8 anos). A crise epiléptica do tipo mioclônica foi a mais frequente, ocorrendo em todos os pacientes, enquanto que do tipo tônico-clônica generalizada nos casos 3 e 5.

Outras manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes foram: ataxia cerebelar (5/6), fraqueza muscular (5/6), neuropatia periférica (3/6), lipomas múltiplos (2/6), cefaléia (2/6), vômitos (2/6), demência (2/6), ptose palpebral (2/6), oftalmoparesia (2/6) e intolerância ao exercício (1/6).

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

As crises epilépticas foram controladas em todos os pacientes, sendo a resposta ao uso de medicação antiepiléptica descrita na tabela 4.

Tabela 3. Descrição clínica dos pacientes com MERRF.

| Manifestação Clínica | Caso | | | | | |
|---------------------------|------|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Idade * | 27 | 34 | 54 | 51 | 50 | 43 |
| Sexo | M | M | F | M | M | F |
| Tempo de evolução ** | 15 | 11 | 3 | 2 | 15 | 5 |
| Manifestação Clínica | | | | | | |
| Mioclonia | + | + | + | + | + | + |
| Epilepsia | + | + | + | + | + | + |
| Ataxia cerebelar | - | + | + | + | + | + |
| Fraqueza | - | + | + | + | + | + |
| Neuropatia periférica | - | - | + | + | + | - |
| Múltiplos lipomas | - | - | + | + | - | - |
| Cefaléia | + | - | - | - | - | + |
| Vômitos | + | - | + | - | - | - |
| Demência | - | - | - | + | + | - |
| Ptose palpebral | + | - | + | - | - | - |
| Oftalmoparesia | + | - | + | - | - | - |
| Intolerância ao exercício | - | - | - | - | - | + |

*: anos; **: anos início da mioclonia ou epilepsia e o diagnóstico de MERRF;

***: mesma família nos casos 2, 4 e 6; F: feminino; M: masculino; +: presente;

-: ausente.

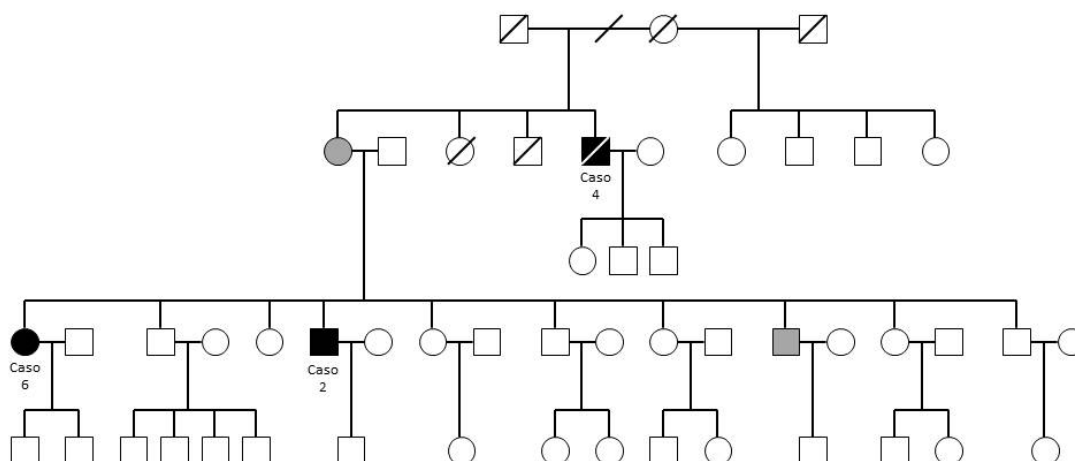


Figura 3. Heredograma nos casos 2, 4 e 6.

Tabela 4. Resposta ao tratamento dos pacientes com MERRF.

| Medicamento | Caso | | | | | |
|-----------------|------|----------|---|---|----------|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Clonazepan | N | N | + | - | + | + |
| Carbamazepina | - | - | - | - | - | N |
| Fenobarbital | - | <u>+</u> | - | N | <u>+</u> | N |
| Fenitoína | - | - | - | N | - | + |
| Lamotrigina | N | N | N | N | - | N |
| Ácido valpróico | + | + | + | + | + | + |

+: controlada; ±: controle parcial; -: não controlada; N: não foi utilizado.

5.2 EXAME LABORATORIAL

A dosagem sérica da CK foi realizada em todos os pacientes (Tabela 5). O nível sérico da CK estava elevado em 5 pacientes sendo normal em apenas um paciente.

A dosagem sérica do ácido láctico foi realizada em todos os pacientes (Tabela 5). O nível de ácido láctico sérico estava elevado em 5 pacientes estudados sendo normal em um paciente.

A dosagem de proteína no LCR foi realizada em cinco pacientes (Tabela 5). O nível de proteína do LCR estava elevado em um paciente e foi normal em outros 4 pacientes.

Tabela 5. Alterações laboratoriais dos pacientes com MERRF.

| Caso | CK (U/L)* | Ácido Láctico (mg/dl)** | Proteína do LCR (mg/dl)*** |
|-------------|----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 92 | 25,0 | 30 |
| 2 | 294 | 47,0 | 42 |
| 3 | 414 | 32,4 | NR |
| 4 | 366 | 21,2 | 39 |
| 5 | 342 | 40,5 | 63 |
| 6 | 315 | 34,4 | 18 |

CK: creatina quinase; LCR: líquido cefalorraquiano; N: normal; NR: não realizado; *: valor normal entre 29 e 129 U/L; **: valor normal \leq 22 mg/dl; ***: valor normal \leq 45 mg/dl.

5.3 ELETROCARDIOGRAMA

As alterações eletrocardiográficas, observadas em 6 pacientes, mostraram distúrbio de condução do ramo direito nos casos 3 e 4; anormalidade não específica da onda T (alteração inespecífica da repolarização ventricular) nos casos 3, 4 e 6; e foi normal nos restantes 3 pacientes (casos 1, 2 e 5).

A tabela 6 descreve os achados eletrocardiográficos dos pacientes com MERRF.

5.4 ELETRONEUROMIOGRAFIA

O padrão da eletromiografia de agulha, observado em 6 pacientes, foi miopático nos casos 2 e 6, misto (miopático e desenergado) com descargas miotônicas no caso 3, desenergado nos casos 4 e 5, e normal no caso 1.

O estudo de condução nervosa mostrou neuropatia axonal sensitiva e motora em três pacientes (caso 3, 4 e 5) sendo normal no restante dos pacientes (casos 1, 2 e 6).

A tabela 6 descreve os achados da eletroneuromiografia (eletromiografia de agulha e estudo da condução nervosa) dos pacientes com MERRF.

Tabela 6. Achados eletrofisiológicos dos pacientes com MERRF.

| Caso | ECG | EMG | ECN |
|-------------|------------|------------|------------|
| 1 | N | N | N |
| 2 | N | M | N |
| 3 | BRD + ARV | M + D | NASM |
| 4 | BRD + ARV | D | NASM |
| 5 | N | D | NASM |
| 6 | ARV | M | N |

ECG: eletrocardiograma; EMG: eletromiografia de agulha; ECN: estudo da condução nervosa; N: normal; BRD: distúrbio de condução do ramo direito; ARV: alteração da repolarização ventricular; D: padrão de deservação; M: padrão miopático; NASM: neuropatia axonal sensitivo motora.

5.5 ELETROENCEFALOGRAMA

As alterações eletroencefalográficas, observadas no EEG interictal em 6 pacientes, mostraram:

(1) atividade de fundo com ondas delta intermitentes e difusas nos casos 2 e 3; ondas theta intermitentes e difusas nos casos 4 e 5; ondas delta e theta intermitentes e difusas no caso 6; e normal no caso 1;

(2) descargas epileptiformes generalizadas do tipo ponta, poliponta e ponta-onda irregular nos casos 1, 2 e 5; ponta-onda lenta com predomínio posterior no caso 4; ponta-onda lenta no caso 6; e foi normal no caso 3; e

(3) estímulo fótico intermitente: fotossensível nos casos 2 e 3 sendo normal nos restantes 4 pacientes.

A tabela 7 descreve os achados eletroencefalográficos dos pacientes com MERRF.

Tabela 7. Achados do EEG interictal dos pacientes com MERRF.

| Caso | EEG interictal | | |
|------|---|---|---------------------------------------|
| | Atividade de Fundo | Atividade Epileptiforme | Resposta Fotoestimulação Intermitente |
| 1 | Normal | Pontas, polipontas e ponta-onda irregular generalizadas | Ausente |
| 2 | Atividade delta intermitente e difusa | Pontas, polipontas e ponta-onda irregular generalizadas | Fotossensível |
| 3 | Atividade delta intermitente e difusa | Ausente | Fotossensível |
| 4 | Atividade theta intermitente e difusa | Ponta-onda lenta generalizada com predomínio posterior | Ausente |
| 5 | Atividade theta intermitente e difusa | Pontas, polipontas e ponta-onda irregular generalizadas | Ausente |
| 6 | Atividade delta-theta intermitente e difusa | Ponta-onda lenta generalizada | Ausente |

EEG: eletroencefalograma.

5.6 ESTUDO NEURORRADIOLÓGICO

O estudo radiológico encefálico foi feito por tomografia computadorizada em 2 pacientes (casos 1 e 2) e por imagem de ressonância

magnética (IRM) em 4 pacientes (casos 3, 4, 5 e 6). A presença de atrofia cerebral e cerebelar difusa foi encontrada em 4 pacientes (casos 3, 4, 5, e 6). Discretas áreas multifocais de hiperintensidade em substância branca foram encontradas somente no caso 6 (Tabela 8).

A figura 4 ilustra o padrão radiológico de atrofia cerebral e cerebelar difusa associada a áreas de alteração de substância branca no caso 6.

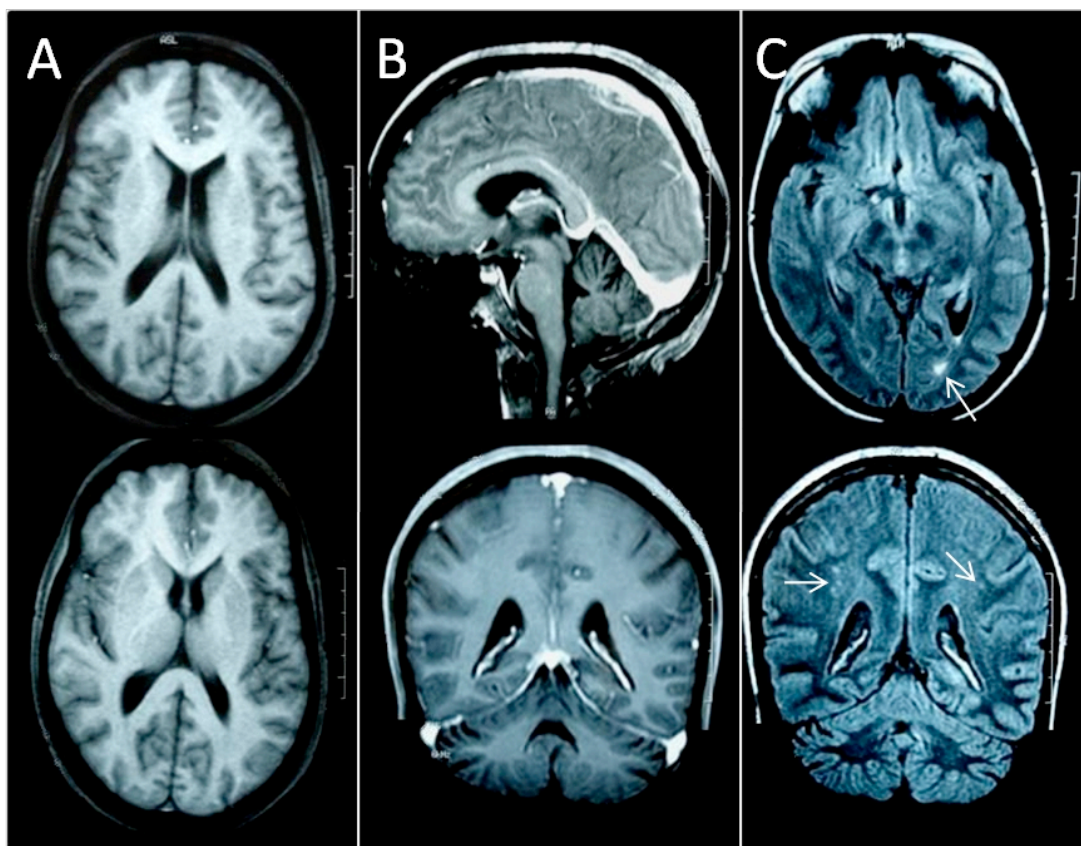


Figura 4. Imagem por ressonância magnética de crânio mostrando atrofia cortical difusa (cerebral e cerebelar) e alteração da substância branca (setas) no caso 6. (A: imagens ponderadas em T1; B: imagens ponderadas em T1 com contraste; e C: imagens ponderadas em FLAIR).

Tabela 8. Achados neurorradiológicos dos pacientes com MERRF.

| Caso | Tipo | Alteração |
|------|------|--|
| 1 | TC | Normal |
| 2 | TC | Normal |
| 3 | IRM | Atrofia cerebral e cerebelar difusa |
| 4 | IRM | Atrofia cerebral e cerebelar difusa |
| 5 | IRM | Atrofia cerebral e cerebelar difusa |
| 6 | IRM | Atrofia cerebral e cerebelar difusa, alteração substância branca periventricular |

TC: tomografia computadorizada; IRM: imagem por ressonância magnética.

5.7 BIÓPSIA MUSCULAR

A coloração pelo TGM e a reação histoquímica para SDH e COX foram realizadas em todos os pacientes.

A presença de fibras musculares com acúmulo de mitocôndrias, formando RRF, esteve presente em todos os pacientes, mas sua frequência variou de 0,5% até 7,9% na coloração pelo TGM e de 0,9% até 8,4% na reação histoquímica para SDH. Frequência de fibras com acúmulo de mitocôndrias formando RRF acima de 2% foi encontrada em 66,6% dos pacientes tanto na coloração pelo TGM quanto na reação histoquímica para SDH. A reação histoquímica mostrou que a atividade da COX apresentava deficiência em cinco pacientes, nos quais foram encontradas fibras COX-variando de 10,4% até 59,3%.

Vaso SDH+ não foi encontrado em nenhum dos pacientes (Tabela 9).

A tabela 9 descreve os achados morfológicos da biópsia muscular na coloração pelo TGM e na reação histoquímica para SDH e COX dos pacientes com MERRF.

As figuras 5 e 6 mostram a presença de RRF na coloração pelo TGM e reação histoquímica para SDH no caso 3.

A figura 7 mostra fibras musculares com atividade deficiente da COX (COX-) no caso 3.

A figura 8 mostra vasos com reação normal para SDH no caso 3.

Tabela 9. Características das fibras musculares e vasos na biópsia muscular dos pacientes com MERRF.

| Caso | RRF (%) | | COX- (%) | Vaso SDH+ |
|------|---------|------|----------|-----------|
| | TGM | SDH+ | | |
| 1 | 2,4 | 3,6 | 59,3 | 0 |
| 2 | 2,3 | 3,2 | 0 | 0 |
| 3 | 7,9 | 8,4 | 12,0 | 0 |
| 4 | 0,5 | 0,9 | 10,4 | 0 |
| 5 | 3,5 | 7,1 | 30,0 | 0 |
| 6 | 0,8 | 1,4 | 18,7 | 0 |

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.

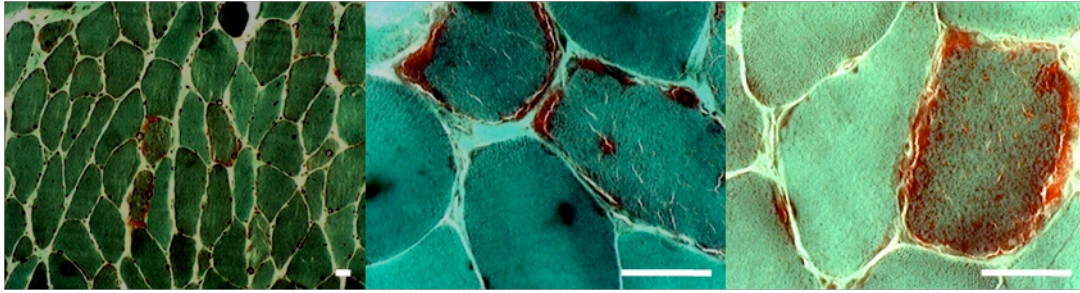


Figura 5. A presença de RRF na coloração pelo TGM no caso 3. Barra = 50um.

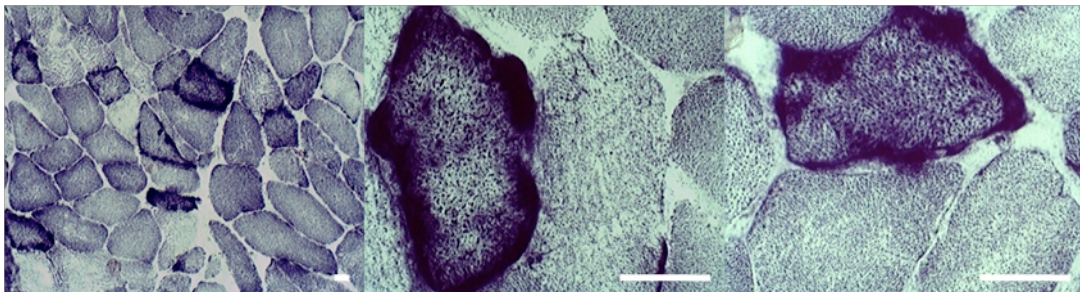


Figura 6. A presença de fibras granulares (SDH+) na reação histoquímica para SDH no caso 3. Barra = 50um.

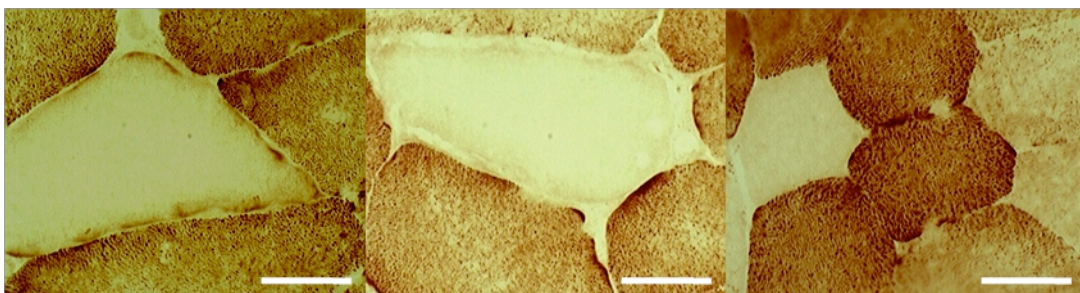


Figura 7. A presença de fibras com atividade deficiente da COX (COX-) no caso 3. Barra = 50um.

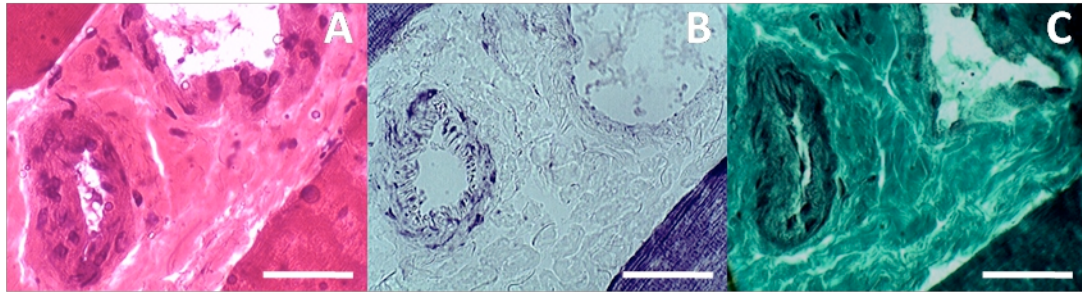


Figura 8. O comportamento dos vasos nas colorações pelo HE e TGM (A e C) e atividade normal do vaso na reação histoquímica para SDH (B) no caso 3. Barra = 50um.

5.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL

5.8.1 Identificação das mutações no DNAm_t

A combinação das técnicas de PCR/RLFP e sequenciamento utilizadas para identificar mutação no gene $tRNA^{Lys}$ e por PCR/RLFP no gene $tRNA^{Leu(UUR)}$ do DNAm_t encontrou mutação de ponto em cinco dos pacientes estudados (casos 2, 3, 4, 5 e 6), como especificado na Tabela 10.

5.8.1.1 Estudo molecular da mutação na posição 8344 do DNAm_t

A pesquisa da mutação de ponto A8344G do DNAm_t foi realizada em 6 pacientes por PCR/RLFP. A digestão do produto de PCR com enzima de restrição forneceu dois fragmentos (78 e 21 pb) no DNAm_t de um paciente (caso 1) mostrando que esse paciente não possui mutação nesse ponto do

seu DNAMt, enquanto que 5 pacientes (casos 2, 3, 4, 5 e 6) apresentaram quatro fragmentos (78, 52, 26 e 21 pb) no DNAMt confirmando neles a presença de DNAMt mutante (Figura 9).

5.8.1.2 Sequenciamento do gene tRNA^{Lys} do DNAMt

A pesquisa de outras mutações no gene tRNA^{Lys} do DNAMt foi realizada somente em um paciente (caso 1) que não tinha a mutação de ponto A8344G do DNAMt. O sequenciamento não mostrou presença de mutações conhecidas ou novas no gene tRNA^{Lys} do DNAMt nesse paciente (Figura 9).

5.8.1.3 Estudo molecular da mutação na posição 3243 do DNAMt

A pesquisa da mutação de ponto A3243G do DNAMt foi realizada somente no paciente que não tinha mutações no gene tRNA^{Lys} (caso 1). A digestão do produto de PCR com enzima de restrição forneceu três fragmentos (169, 37 e 32 pb) no DNAMt mostrando que esse paciente não possui mutação nesse ponto do seu DNAMt.

Tabela 10. Resultado do estudo molecular dos pacientes com MERRF.

| Técnica: | Caso | | | | | |
|------------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mutação do DNAm | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| PCR/RLFP: | | | | | | |
| A8344G | - | + | + | + | + | + |
| Sequenciamento: | | | | | | |
| A8344G | - | NR | NR | NR | NR | NR |
| T8356C | - | NR | NR | NR | NR | NR |
| G8361A | - | NR | NR | NR | NR | NR |
| G8363A | - | NR | NR | NR | NR | NR |
| Novas mutações | - | NR | NR | NR | NR | NR |
| PCR/RLFP: | | | | | | |
| A3243G | - | NR | NR | NR | NR | NR |

-: ausente; +: presente; NR: não realizado; PCR/RFLP: reação em cadeia da polimerase com polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição

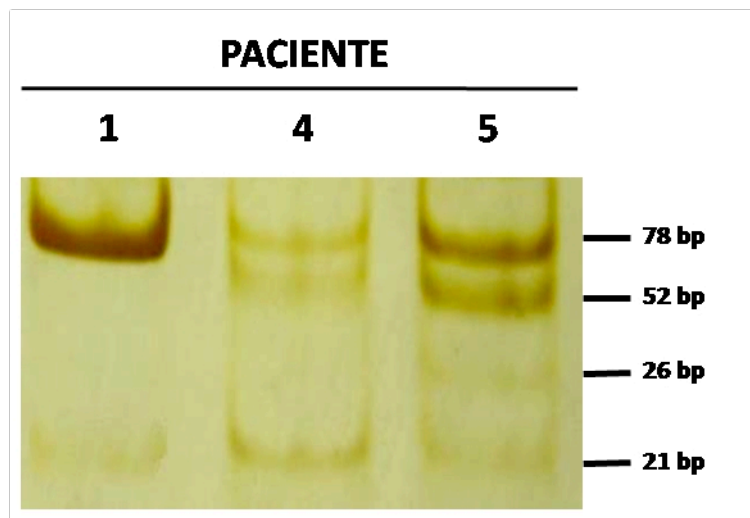


Figura 9. Na presença da mutação de ponto A8344G os pacientes apresentaram quatro fragmentos (78, 52, 26 e 21 pb) confirmando neles a presença de DNAm_t mutante quando submetidos à PCR/RLFP comparados aos dois fragmentos (78 e 21 pb) de pacientes com DNAm_t sem essa mutação.

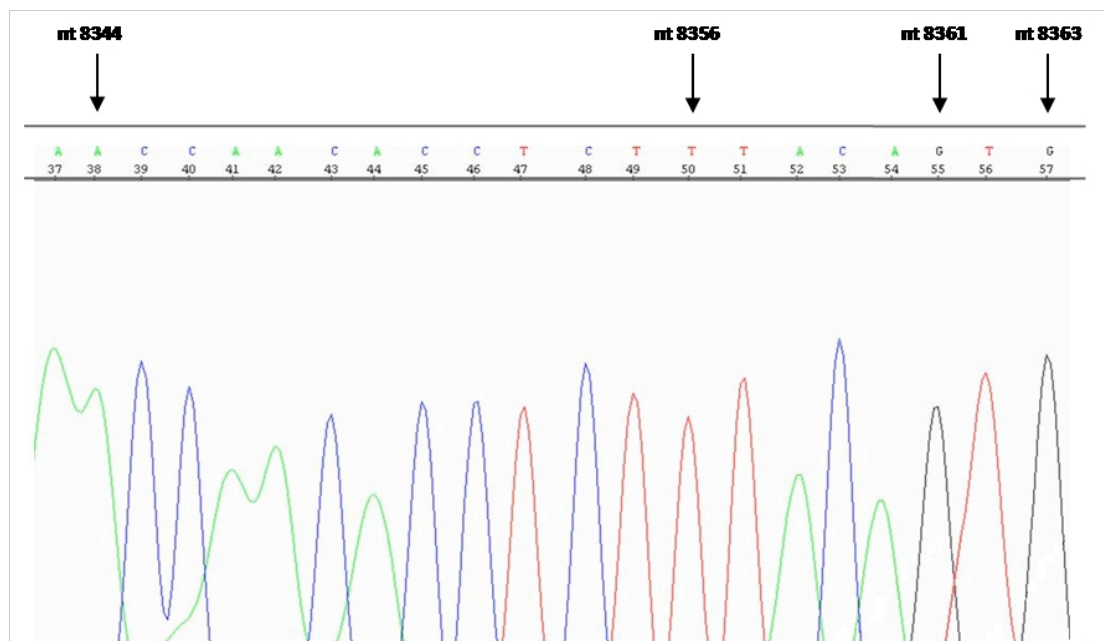


Figura 10. Sequenciamento do gene tRNA^{Lys} do DNAm_t do caso 1 mostrando ausência de mutações conhecidas por causarem o fenótipo de MERRF (setas) ou novas mutações no DNAm_t.

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Embora o início das manifestações clínicas ocorra frequentemente na infância e no adulto jovem, o início tardio no adulto não é incomum nos pacientes com MERRF [DiMAURO et al., 2002; FINSTERER, 2004]. Além disso, a idade de início pode ser diferente entre os membros afetados de uma mesma família [FUKUHARA, 1995]. O desenvolvimento psicomotor na infância costuma ser normal em quase todos os pacientes com MERRF [DiMAURO et al., 2002]. Isso também foi observado na nossa amostra, uma vez que em quatro dos pacientes o início das manifestações clínicas foi após os 40 anos de idade e o desenvolvimento psicomotor na infância foi normal em todos os pacientes.

Os sintomas clínicos têm alta variabilidade nos pacientes com doenças mitocondriais, mas como a presença de mioclonia, bem como, de epilepsia são critérios diagnósticos de MERRF é esperado que todos os pacientes tenham essas manifestações clínicas [DiMAURO et al., 2002; FUKUHARA, 1995]. As mioclonias podem ocorrer isoladamente ou associada com crises epilépticas generalizadas, sendo achado semelhante ao encontrado em nossa amostra [DiMAURO et al., 2002; FINSTERER, 2004]. Alguns dos achados clínicos podem estar ausentes na fase inicial da doença, enquanto que na fase avançada da doença os pacientes costumam ter manifestação clínica mais uniforme [FUKUHARA, 1995; OZAWA et al, 1995; ZEVIANI et al, 1991].

A ataxia cerebelar é uma das manifestações clínicas mais comuns de MERRF e contribui para formar os critérios diagnósticos de MERRF. A

presença de ataxia cerebelar ocorre em até 50% dos casos, sendo encontrada em 83,3% dos nossos pacientes, confirmando os resultados dos estudos anteriores que associam sua presença com MERRF, porém o pequeno número de pacientes da nossa amostra pode ter influenciado esse resultado [CHINNERY et al, 1997; MANCUSO et al, 2013].

Dentre as doenças mitocondriais, a presença de múltiplos lipomas esta mais relacionadas com MERRF, principalmente na presença de mutações no gene do tRNA^{Lys}, podendo ocorrer de 3% até 32,4% dos casos [CHINNERY et al, 1997; DiMAURO et al, 2002; KAZACOS et al, 2012; LARSSON et al, 1995; MANCUSO et al, 2013; TEIVE et al, 2008]. Os nossos pacientes apresentaram múltiplos lipomas em 33,3% dos casos (todos com a mutação ponto A8344G), embora o pequeno número de pacientes da nossa amostra pode ter influenciado essa maior incidência, isso também contribui para mostrar a existencia de uma correlação entre mutação do tRNA^{Lys} e múltiplos lipomas.

As demais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes estudados foram semelhantes à literatura, sendo que alguns dos achados, como neuropatia periférica, cefaléia, vômitos, demência, ptose palpebral, oftalmoparesia, intolerância ao exercício, quando encontrados isoladamente são inespecíficos para MERRF, sugerindo que os episódios de crise epiléptica e mioclonia aparecem de forma súbita em indivíduos aparentemente normais.

Os sintomas clínicos podem ter frequência diferente nos pacientes com MERRF dependendo do tipo de mutação ponto do DNAm, como nos pacientes com a mutação T8356C que apresentam sobreposição de alguns dos sintomas de MELAS, como episódios semelhantes a acidente vascular

cerebral isquêmico, bem como, nos pacientes com a mutação G8363A que apresentam miocardiopatia [DiMAURO et al., 2002; GOTO et al, 1991]. Esse fato não pode ser avaliado por esse estudo, uma vez que, não encontramos essas mutações em nossa amostra.

Outros familiares afetados dos pacientes com MERRF podem ser encontrados na frequência de 50% até 81%, mas outros estudos mostram que a história familiar pode ser positiva em até 50% quando a biópsia muscular ou estudo genético são realizados em familiares assintomáticos ou oligossintomáticos [DiMAURO et al., 2002; MAROTTA et al., 2004; ZEVIANI et al, 1991]. Os familiares oligossintomáticos são difíceis de classificar somente com base nos achados clínicos, sendo necessário biópsia muscular ou estudo genético para sua identificação [FUKUHARA et al., 1995; ZEVIANI et al, 1991]. Em nosso grupo de pacientes, três pacientes pertenciam à mesma família, sendo o padrão de herança consistente com transmissão materna em outros membros dessa mesma família, mas nenhum desses outros familiares tivesse a forma completa da doença, bem como não foram submetidos à biópsia muscular ou estudo genético, dificultando sua identificação.

Com relação à resposta ao tratamento antiepiléptico, não foram encontrados estudos controlados comparando a eficácia das diferentes medicações no tratamento de pacientes com MERRF. As crises epiléticas e mioclônias foram controladas em todos os nossos pacientes, sendo que o uso de ácido valpróico não agravou a doença e ainda foi considerado melhor do que outras medicações antiepiléticas no tratamento sintomático dos nossos pacientes.

6.2 EXAME LABORATORIAL

Os níveis séricos da CK estavam aumentados na maioria dos nossos pacientes, mas essa alteração laboratorial é pesquisada raramente nos artigos sobre MERRF, provavelmente refletindo a pouca especificidade desse exame na investigação dessa doença, sendo seu uso maior para o diagnóstico diferencial com outras doenças [MANCUSO et al, 2013].

O nível sérico do ácido láctico é importante no diagnóstico de MERRF porque, como em nossos pacientes, mostra indiretamente a presença de doença mitocondrial em quase todos os pacientes [ZEVIANI et al, 1991]. Também, a elevação do ácido láctico na espectroscopia por IRM de pacientes com MERRF, demonstra correlação direta entre a gravidade do comprometimento neurológico e o nível de ácido láctico no LCR e córtex cerebral [DiMAURO et al, 2002]. Em nossos pacientes, o nível de ácido láctico sérico estava elevado no sangue de 83,5% dos pacientes, semelhante ao descrito na literatura internacional que mostra elevação em até 83% dos casos [DiMAURO et al, 2002; MAROTTA et al., 2004; MANCUSO et al, 2013]. Dessa forma, esse estudo conseguiu mostrar que existe relação entre o nível elevado do ácido láctico e MERRF. Isso é importante porque valida a pesquisa da elevação do ácido láctico na suspeita diagnóstica de pacientes com MERRF.

O nível de proteína no LCR pode estar elevado de 1,6% até 8% dos pacientes com MERRF, mas raramente em níveis maiores do que 100mg/dl [DiMAURO et al, 2002; MAROTTA et al., 2004]. Em nossos pacientes, o nível de proteína no LCR estava elevado em 20% dos pacientes, dos quais, a

determinação foi realizada. O pequeno número de pacientes da nossa amostra, bem como, o fato da dosagem elevada ter sido encontrada em paciente com longo tempo de doença pode ter influenciado a incidência maior que as previamente descritas, mesmo assim, nossos resultados confirmam a que a proteína elevada no LCR pode ser uma das alterações laboratoriais encontradas em pacientes com MERRF.

6.3 ELETROCARDIOGRAMA

Como mencionado previamente, o envolvimento cardíaco pode ocorrer em até 44% dos pacientes com MERRF pela mutação A8344G, sendo que quando presente pode não ser uma das principais manifestações clínicas desses pacientes [DiMAURO et al, 2002, MANCUSO et al, 2013; OZAWA et al, 1995; WAHBI et al, 2010]. Contudo, todos os pacientes com MERRF deveriam realizar exames cardiológicos de rotina, pois essas alterações cardíacas têm terapêuticas específicas, tendo ainda importante impacto sobre o prognóstico desses pacientes [OZAWA et al, 1995; WAHBI et al, 2010]. Nenhum dos nossos pacientes apresentou manifestação clínica sugestiva de cardiopatia, porém a presença de alterações eletrocardiográficas, como a perturbação de condução do ramo direito 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.

Ainda, os sintomas clínicos podem ter frequência diferente nos pacientes com MERRF dependendo do tipo de mutação de ponto do DNAmt.

A presença de miocardiopatia foi frequentemente associada com a mutação G8363A, no entanto, essa mutação não foi encontrada em nossos pacientes [OZAWA et al, 1997; SANTORELLI et al, 1996; VIRGILIO et al, 2009].

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 MERRF 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 nem todos os pacientes do nosso grupo apresentaram padrão miopático típico na eletromiografia de agulha.

Com mencionado anteriormente, a eletromiografia de agulha e o estudo de condução nervosa são consistentes com processo miopático nos

pacientes com MERRF, porém neuropatia pode coexistir em alguns pacientes. BERKOVIC et al, em 1989, encontraram alterações na biópsia de nervo compatíveis com neuropatia axonal confirmando sua associação com MERRF. A presença de polineuropatia axonal ou desmielinizante sensitivo-motora tem sido relatada de 24% até 63% dos pacientes com MERRF, podendo ser decorrente de disfunção mitocondrial do nervo semelhante ao que ocorre em pacientes com outras doenças mitocondriais [BERKOVIC et al, 1989; CHINNERY et al, 1997; DiMAURO et al, 2002; KARPPA et al, 2003]. Dessa forma, a neuropatia axonal encontrada na eletromiografia de agulha e no estudo da condução nervosa em alguns dos nossos pacientes também pode estar correlacionada com sua disfunção mitocondrial.

6.5 ESTUDO NEURORRADIOLÓGICO

As alterações neurorradiológicas observadas em nossos casos são compatíveis com aquelas previamente descritas, demonstrando a atrofia cortical (cerebral e cerebelar) como um achado frequente em pacientes com MERRF [BERKOVIC et al, 1989; DiMAURO et al, 2002; HAAS & DIETRICH, 2004; MANCUSO et al, 2013; OZAWA et al, 1995; SINHA et al, 2007]. Essas alterações também podem ser encontradas em outras doenças mitocondriais ou seja, essas alterações não são um achado neurorradiológico exclusivo de MERRF [DiMAURO et al, 2002; FUKUHARA, 1995; HAAS & DIETRICH, 2004; OZAWA et al, 1995; SINHA et al, 2007]. No entanto, a atrofia cortical encontrada em nosso estudo colabora para demonstrar que existe perda neuronal em pacientes com MERRF, uma vez que a atrofia cortical ao estudo neurorradiológico costuma

ter correlação com a perda neuronal, semelhante ao demonstrado nos estudos anátomo patológicos de pacientes com MERRF [BERKOVIC et al, 1989; DiMAURO et al, 2002; FUKUHARA, 1995].

Nos pacientes que apresentaram estudo neurorradiológico normal foi utilizada somente a tomografia computadorizada como método de investigação, e isso pode ter influenciado esse resultado, uma vez que o uso de IRM pode ser mais sensível para encontrar alterações como a atrofia cortical. Da mesma forma, nos pacientes que realizaram investigação através de IRM não encontramos alterações em núcleo olivar inferior, núcleo denteado cerebelar, núcleo rubro ou ponte, embora alterações dessas estruturas sejam descritas em MERRF. Como em nosso estudo não foram utilizadas técnicas específicas de IRM para análise dessas estruturas, bem como outras técnicas neurorradiológicas, como a espectroscopia, possivelmente nossos achados nesses pacientes também podem ter sido influenciados por essas questões técnicas.

6.6 ELETROENCEFALOGRAMA

Embora epilepsia possa estar presente na manifestação clínica inicial em 53% dos pacientes com doença mitocondrial, poucos estudos correlacionam as manifestações clínicas e as características do EEG nesses pacientes [CANAFOLIA et al, 2001, SO et al, 1989]. A apresentação clínica da epilepsia em 71% dos casos de pacientes com doença mitocondrial ocorre pela presença de crises epiléticas parciais com predomínio dos sintomas motores e atividade epileptiforme do tipo focal ou multifocal no EEG

[CANAFIOLIA et al, 2001]. A apresentação de epilepsia como crises epiléticas do tipo mioclônicas ocorre em somente 16% dos casos de doença mitocondrial, sendo geralmente em pacientes com MERRF acompanhado da mutação A8344G [CANAFIOLIA et al, 2001]. Como descrito anteriormente, a presença de variação no grau de alentecimento da atividade de fundo e atividade epileptiforme generalizada, podendo em 23% dos casos piorar com o estímulo fótico intermitente, são alterações presentes com frequência em pacientes com MERRF, mas essas alterações podem ser encontradas também em pacientes com outras doenças mitocondriais [CANAFIOLIA et al, 2001; OZAWA et al, 1995; SHAHWAN et al, 2005; SINHA et al, 2007; SO et al, 1989]. A resposta a fotoestimulação intermitente pode causar crise epilética em cerca de 15% dos pacientes, mas isso não foi observado em nossa amostra [SO et al, 1989]. Nosso estudo mostra que atividade epileptiforme generalizada ocorre em pacientes com MERRF, contribuindo com o conceito que a menor presença de alterações focais nesses pacientes poderia auxiliar na diferenciação de MERRF com as demais doenças mitocondriais que apresentam epilepsia, como MELAS ou doença de Leigh. No entanto, essas anormalidades são muito semelhantes aquelas encontradas em epilepsias mioclônicas progressivas de etiologia não relacionada com as doenças mitocondriais, não conseguindo diferenciar MERRF dessas outras formas de epilepsia.

6.7 BIÓPSIA MUSCULAR

A biópsia muscular é um importante recurso diagnóstico para MERRF, pois RRF são encontradas acima de 92% dos pacientes com essa doença [BERKOVIC et al, 1989; DiMAURO et al., 2002; FUKUHARA et al, 1995; MANCUSO et al, 2013; OZAWA et al, 1995]. A frequência de RRF variou conforme a coloração ou reação histoquímica utilizada, sendo encontradas RRF variando de 0,5% até 7,9% na coloração pelo TGM e de 0,9% até 8,4% na reação histoquímica para SDH, similar a outros estudos com coloração pelo TGM e reação histoquímica para SDH [DiMAURO et al., 2002; MATSUOKA et al, 1991; OZAWA et al, 1995]. Embora em nosso estudo a coloração para TGM foi semelhante à reação histoquímica para SDH na detecção de RRF, nos pacientes com MERRF a reação histoquímica para SDH costuma ser 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; DiMAURO et al, 2002; LORENZONI et al., 2009].

A maioria dos pacientes com MERRF tem atividade da COX diminuída ou ausente em algumas das fibras musculares [BOURGEOIS & TARNOPOLSKY, 2004; DiMAURO et al., 2002; MATSUOKA et al, 1991; OZAWA et al, 1995; ZEVIANI & DI DONATO, 2004]. A reação histoquímica para COX demonstrou deficiência em cinco dos nossos casos, mas a frequência de fibras COX- foi maior que a de RRF, variando de 10,4% até 59,3%, indicando maior número de fibras com possível deficiência funcional do que com alteração morfológica, caracterizada por proliferação mitocondrial [MATSUOKA et al, 1991; OZAWA et al, 1995].

Os estudos histológicos de pacientes com MERRF, independente do tipo de mutação de ponto, tem mostrado incidência de vasos SDH+ abaixo de 8% [DiMAURO et al, 2002; MANCUSO et al, 2013]. No entanto, nos pacientes com a mutação A8344G podem ser encontrados vasos SDH+ em até 50% das arteríolas intramusculares, mostrando que a incidência dessa alteração também pode estar relacionada com o tipo de mutação do DNAm_t apresentada pelo paciente [HASEGAWA et al, 1993; OZAWA et al, 1995]. Ainda, nos pacientes com MERRF a presença de vaso SDH+ foi correlacionado com atividade deficiente da COX, diferente do que ocorre em pacientes com MELAS [DiMAURO et al, 2002; HASEGAWA et al, 1993; LORENZONI et al, 2009; OZAWA et al, 1995]. Nosso estudo difere dos autores que encontraram uma maior frequência de vasos SDH+ em pacientes com MERRF, o que pode estar relacionado com a presença da mutação A8344G ou com a maior incidência de fibras COX- na biópsia muscular desses pacientes. Importante destacar que esses resultados confirmam que a falta de vasos SDH+ na biópsia muscular não afasta a possibilidade de MERRF.

6.8 ESTUDO MOLECULAR DO DNA MITOCONDRIAL

Desde os primeiros estudos descrevendo a associação de mutações de ponto no DNAm_t com o fenótipo típico de MERRF, por SHOFFNER et al e YONEDA et al, em 1990, a mutação ponto A8344G é a mais frequente em pacientes com MERRF sendo encontrada em cerca de 80% a 90% dos casos [HIRANO & DiMAURO, 1996; DiMAURO & HIRANO, 2009; DiMAURO et al, 2002; HAMMANS et al, 1991]. Nossa amostra também contribui para afirmar que essa

mutação é a mais frequente associada com o fenótipo típico de MERRF 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 presença de outras mutações no gene tRNA^{Lys}, como as conhecidas mutações ponto nas posições 8356, 8361 ou 8363, foram descritas em cerca de 10% dos casos de MERRF, porém não foram encontradas em nossos pacientes [DiMAURO & HIRANO, 2009].

Interessante notar que o paciente onde não foi encontrada mutação no gene tRNA^{Lys} do DNAm^t não apresentava ataxia cerebelar, o que pode ocorrer na fase inicial da doença ou nos casos em que uma mutação de outro gene do DNAm^t estaria responsável pela doença. A mutação A3243G do gene tRNA^{Leu(UUR)} do DNAm^t, que ocorre em cerca de 80% dos pacientes com MELAS, também foi analisado nesse paciente pela frequente sobreposição de MERRF com MELAS, mas essa mutação de ponto também não foi encontrada nesse paciente [BRACKMANN et al, 2012; CRIMMIMS et al, 1993; FABRIZI et al, 1996; FOLGERO et al, 1995; LORENZONI et al, 2009]. Como o paciente apresenta ptose palpebral e oftalmoparesia, bem como biópsia muscular com grande proporção de fibras musculares com deficiência da COX, semelhante ao que pode ocorrer em pacientes com PEO e síndrome de Kearns-Sayre, a presença de mutações do DNAm^t do tipo rearranjo, embora raramente descrito associada com MERRF, também poderia ser uma possibilidade nesse caso [BLUMENTHAL et al, 1998].

Portanto, a possibilidade de outras mutações acometendo o DNAm^t não foi afastada pelo presente estudo, pois no momento existem outras

mutações associadas a MERRF (Tabela 2), mas que por razões técnicas não foram estudadas, pois procuramos enfatizar nossa busca nas mais frequentes do gene tRNA^{Lys}.

A suspeita de MERRF pode ser feita com base nas alterações encontradas na avaliação clínica, exame laboratorial, eletrocardiograma, eletroencefalograma, eletroneuromiografia e análise neurorradiológica, sendo confirmada pela biópsia muscular e estudo molecular do DNAm^t. 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^{Lys} do DNAm^t tenha resultados significativos, em nosso caso quando o DNAm^t foi extraído a partir de músculo acometido pela doença, a pesquisa de RRF na biópsia muscular ainda mostra-se semelhante aos resultados do estudo molecular para o diagnóstico de MERRF. Isso pode ser observado principalmente na pesquisa de RRF, onde todos os nossos pacientes apresentavam RRF na biópsia muscular, enquanto que mutação no gene tRNA^{Lys} do DNAm^t foi encontrada em cinco pacientes da nossa amostra.

7 CONCLUSÕES

7.1 Com relação às características das manifestações clínicas, laboratoriais, eletrofisiológicas e morfológicas:

7.1.1 A presença de ataxia cerebelar e fraqueza muscular pode ser considerada critério de inclusão para MERRF associada com a mutação ponto A8344G do DNAm_t;

7.1.2 Nível sérico elevado de ácido láctico é encontrado como alteração típica de MERRF;

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

7.1.4 Nos pacientes com MERRF a reação histoquímica para SDH é semelhante à coloração pelo TGM na identificação de RRF;

7.1.5 A deficiência de COX ocorre na maioria dos pacientes com MERRF; e

7.1.6 A falta de vasos SDH⁺ na biópsia muscular não exclui o diagnóstico da doença.

7.2 Com relação à frequência das mutações do gene tRNA^{Lys} do DNAm_t:

7.2.1 A mutação de ponto A8344G do DNAm_t é a mais frequente relacionada com MERRF.

7.2.2 A análise isolada de mutações do gene tRNA^{Lys} do DNAm_t não afasta o diagnóstico de MERRF.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Arruda WO, Torres LFB, Lombes A, DiMauro S, Cardoso BA, Teive HA, De Paola D, Seixas RR. Mitochondrial myopathy and myoclonic epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr* 1990; 48: 32-43.
- Barkovich AJ, Good WV, Koch TK, Berg BO. Mitochondrial disorders: analysis of their clinical and imaging characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993; 14: 1119-1137.
- Berkovic SF, Carpenter S, Evans A, Karpati G, Shoubridge EA, Andermann F, Meyer E, Tyler JL, Diksic M, Arnold D, Wolfe LS, Andermann E, Hakim AM. Myoclonus epilepsy and ragged-red fibres (MERRF). 1. A clinical, pathological, biochemical, magnetic resonance spectrographic and positron emission tomographic study. *Brain* 1989; 112: 1231-1260.
- Berkovic SF, Shoubridge EA, Andermann F, Andermann E, Carpenter S, Karpati G. Clinical spectrum of mitochondrial DNA mutation at base pair 8344. *Lancet* 1991; 338: 457.
- 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, Lightowlers RN, Turnbull DM. Neuropathological aspects of mitochondrial DNA disease. *Neurochem Res* 2004; 29: 505-511.

- Bindoff LA, Desnuelle C, Birch-Machin MA, Pellissier J-F, Serratrice G, Dravet C, Bureau M, Howell N, Turnbull DM. Multiple defects of the mitochondrial respiratory chain in a mitochondrial encephalopathy (MERRF): a clinical, biochemical and molecular study. *J Neurol Sci* 1991;102:17-24.
- Blakely EL, Trip SA, Swalwell H, He L, Wren DR, Rich P, Turnbull DM, Omer SE, Taylor RW. A new mitochondrial transfer RNAPro gene mutation associated with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers and other neurological features. *Arch Neurol* 2009; 66: 399-402.
- Blumenthal DT, Shanske S, Schochet SS, Santorelli FM, DiMauro S, Jaynesm M, Bodensteiner J. Myoclonus epilepsy with ragged red fibers and multiple mtDNA deletions. *Neurology*. 1998; 50: 524-525.
- Börner GV, Zeviani M, Tiranti V, Carrara F, Hoffmann S, Gerbitz KD, Lochmüller H, Pongratz D, Klopstock T, Melberg A, Holme E, Pääbo S. Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients. *Hum Mol Genet* 2000; 9 :467-475.
- Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA-lys mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1187-1200.
- Bourgeois JM, Tarnopolsky MA. Pathology of the skeletal muscle in mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2004; 4: 441-452.
- Brackmann F, Abicht A, Ahting U, Schröder R, Trollmann R. Classical MERRF phenotype associated with mitochondrial tRNA(Leu) (m.3243A>G) mutation. *Eur J Pediatr* 2012; 171: 859-862.
- Brinckmann A, Weiss C, Wilbert F, von Moers A, Zwirner A, Stoltenburg-Didinger G, Wilichowski E, Schuelke M. Regionalized pathology correlates with augmentation of mtDNA copy numbers in a patient with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers (MERRF-syndrome). *PLoS One* 2010; 5: e13513.

- Brini M, Pinton P, King MP, Davidson M, Schon EA, Rizzuto R. A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nat Med* 1999; 5: 951-954.
- Canafoglia L, Franceschetti S, Antozzi C, Carrara F, Farina F, Granata T, Lamantea E, Savoirdo 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.
- Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* 1997; 120: 1713-1721.
- Chung E, Van Woert MH. Myoclonus: sites and mechanism of action. *Exp Neurol* 1984; 85: 273-282.
- 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.
- Cock H, Schapira AHV. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Epilepsia* 1999; 40(suppl 3): 33-40.
- Collins S, Dennett X, Byrne E. Contrasting histochemical features of various mitochondrial syndromes. *Acta Neurol Scand* 1995; 91: 287-293.
- Coquet M, Degoul F, Vital A, Malgat M, Mazat JP, Louvet-Giendaj C, Fontan D, Tison F, Diry M, Marsac C. Merrf family with 8344 mutation in tRNA (lys). Evidence of a mitochondrial vasculopathy in muscle biopsies. *Neuromuscul Disord* 1993; 3: 593-597.

- Crimmins D, Morris JG, Walker GL, Sue CM, Byrne E, Stevens S, Jean-Francis B, Yiannikas C, Pamphlett R. Mitochondrial encephalomyopathy: variable clinical expression within a single kindred. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993; 56: 900-905.
- Cunha FMB, Werneck MCM, Scola RH, Werneck LC. Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle Nerve* 2006; 33: 409-414.
- 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. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658: 80-88.
- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, DeVivo DC. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1985; 17: 521.
- DiMauro S, Hirano M. MERRF: Myoclonic Epilepsy Associated with Ragged Red Fibers. GeneReviews [Internet]. Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1520/>. Acesso em Setembro de 2011.
- DiMauro S, Hirano M, Kaufmann P, Tanji K, Sano M, Shungu DC, Bonilla E, DeVivo DC. Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. *Adv Neurol* 2002; 89: 217-229.
- DiMauro S, Kulikova R, Tanji K, Bonilla E, Hirano M. Mitochondrial genes for generalized epilepsies. *Adv Neurol* 1999; 79: 411-419.

- 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.
- Ekbom K. Hereditary ataxia, photomyoclonus, skeletal deformities and lipoma. *Acta Neurol Scand* 1975; 51: 393–404.
- Emmanuele V, Silvers DS, Sotiriou E, Tanji K, DiMauro S, Hirano M. MERRF and Kearns-Sayre overlap syndrome due to the mitochondrial DNA m.3291T>C mutation. *Muscle Nerve* 2011; 44: 448-451.
- Engel WK, Cunningham GG. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 1963; 13: 919-923.
- Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(lys) and premature translation termination. *Nature Genet* 1995; 10:47-55.
- 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.

- Fabrizi GM, Cardaioli E, Grieco GS, Cavallaro T, Malandrini A, Manneschi L, Dotti MT, Federico A, Guazzi G. The A to G transition at nt 3243 of the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) may cause an MERRF syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 47-51.
- 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.
- Finsterer J. Mitochondrial ataxias. *Can J Neurol Sci* 2009; 36: 543-553.
- Finsterer J. Mitochondriopathies. *Eur J Neurol* 2004; 11: 163-186.
- Fischel-Godsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss: paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 15-19.
- Folbergrová J, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Mitochondrion* 2012;12: 35-40.
- Folgero T, Torbergesen T, Oian P. The 3243 MELAS mutation in a pedigree with MERRF. *Eur Neurol* 1995; 35: 168-171.
- Fukuhara N. Clinicopathological features of MERRF. *Muscle Nerve* 1995; Suppl 3: S90-S94.
- Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, et al. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome. *J Neurol Sci* 1980; 47: 117-133.
- 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. Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve* 1995; Suppl 3: S107-S112.
- Haas R, Dietrich R. Neuroimaging of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2004; 4: 471-490.
- Hahn A, Schänzer A, Neubauer BA, Gizewski E, Ahting U, Rolinski B. MERRF-like phenotype associated with a rare mitochondrial trnaile mutation (m.4284 G>A). *Neuropediatrics* 2011; 42: 148-151.
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Mitochondrial encephalopathies: molecular genetic diagnosis from blood samples. *Lancet* 1991; 337: 1311-1313.
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Lennox GG, Lawton NF, Kennedy CR, Morgan-Hughes JA, Harding AE. The mitochondrial DNA transfer RNA(Lys)A-->G(8344) mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain* 1993; 116: 617-632.
- Hasegawa H, Matsuoka T, Goto Y, Nonaka I. Cytochrome c oxidase activity is deficient in blood vessels of patients with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers. *Acta Neuropathol* 1993; 85: 280-284.
- 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.
- Herrero-Martín MD, Ayuso T, Tuñón MT, Martín MA, Ruiz-Pesini E, Montoya J. A MELAS/MERRF phenotype associated with the mitochondrial DNA 5521G>A mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 81: 471-472.

- Hirano M, DiMauro S. Clinical features of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. In: Lane RJM, ed. *Handbook of Muscle Disease*. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1996:479-504.
- Holme E, Larsson NG, Oldfors A, Tulinius M, Sahlin P, Stenman G. Multiple symmetric lipomas with high levels of mtDNA with the tRNA(Lys) A>G(8344) mutation as the only manifestation of disease in a carrier of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 551-556.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-719.
- Ito S, Shirai W, Asahina M, Hattori T. Clinical and brain MR imaging features focusing on the brain stem and cerebellum in patients with myoclonic epilepsy with ragged-red fibers due to mitochondrial A8344G mutation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008; 29: 392-395.
- James AM, Sheard PW, Wei YH, Murphy MP. Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem* 1999; 259: 462-469.
- 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.
- Kazakos K, Kotsa K, Yavropoulou M, Dionyssopoulos A, Grabs R, Yovos J, Polychronakos C. Familial clustering strongly suggests that the phenotypic variation of the 8344 A>G lys mitochondrial tRNA mutation is encoded in cis. *Ann Hum Genet* 2012; 76: 296-300.

- Kilbride SM, Telford JE, Tipton KF, Davey GP. Partial inhibition of complex I activity increases Ca-independent glutamate release rates from depolarized synaptosomes. *J Neurochem* 2008; 106: 826-834.
- Kunz WS. The role of mitochondria in epileptogenesis. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 179-184.
- Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfors A. Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve* 1995; 3: S102-S106.
- Lightowers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet* 1997; 11: 450-455.
- Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CSK, Arndt RC, Freund AA, Bruck I, Santos MLSF, Werneck LC. MELAS: clinical features, muscle biopsy and molecular genetics. *Arq Neuropsiquiatr* 2009; 67: 668-676.
- 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.
- Mancuso M, Filosto M, Mootha VK, Rocchi A, Pistolesi S, Murri L, DiMauro S, Siciliano G. A novel mitochondrial tRNAPhe mutation causes MERRF syndrome. *Neurology* 2004; 62: 2119-2121.
- Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi G, Minetti C, Moggio M, Mongini T, Servidei S, Tonin P, Toscano A, Uziel G, Bruno C, Caldarazzo Ienco E, Filosto M, Lamperti C, Martinelli D, Moroni I, Musumeci O, Pegoraro E, Ronchi D, Santorelli F, Sauchelli D, Scarpelli M, Sciacco M, Spinazzi M, Valentino M, Vercelli L, Zeviani M, Siciliano G. Phenotypic heterogeneity of the 8344A>G mtDNA "MERRF" mutation. *Neurology* 2013; 80: 2049-2054.

- Mancuso M, Petrozzi L, Filosto M, Nesti C, Rocchi A, Choub A, Pistolesi S, Massetani R, Fontanini G, Siciliano G. MERRF syndrome without ragged-red fibers: the need for molecular diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354: 1058-1060.
- Marotta R, Chin J, Quigley A, Katsabanis S, Kapsa R, Byrne E, Collins S. Diagnostic screening of mitochondrial DNA mutations in Australian adults 1990-2001. *Int Med J* 2004; 34: 10-19.
- Marquetti, PCR. Noções de Eletrocardiograma. Avaliado em: <http://www.hc.ufpr.br/?q=blog/45> (acesso em 10 de julho de 2013).
- Martín-Jiménez R, Martín-Hernández E, Cabello A, García-Silva MT, Arenas J, Campos Y. Clinical and cellular consequences of the mutation m.12300G>A in the mitochondrial tRNA(Leu(CUN)) gene. *Mitochondrion*. 2012; 12: 288-293.
- Matsuoka T, Goto Y, Yoneda M, Nonaka I. Muscle histopathology in myoclonus epilepsy with ragged-red fibers (MERRF). *J Neurol Sci* 1991; 106: 193-198.
- 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.
- 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.
- Mita S, Tokunaga M, Uyama E, Kumamoto T, Uekawa K, Uchino M. Single muscle fiber analysis of myoclonus epilepsy with ragged-red fibers. *Muscle Nerve* 1998; 21: 490-497.

MITOMAP database. Avaliado em: <http://www.mitomap.org> (acesso em 25 de maio de 2013).

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.

Morgan-Hughes JA, Schapira AH, Cooper JM, Hayes DJ, Clark JB. Human mitochondrial respiratory chain deficiencies. *Aust Paediatr J* 1988; 24(Suppl 1): 55-57.

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.

Nishigaki Y, Tadesse S, Bonilla E, Shungu D, Hersh S, Keats BJ, Berlin CI, Goldberg MF, Vockley J, DiMauro S, Hirano M. A novel mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in a patient with features of MERRF and Kearns-Sayre syndrome. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 334-340.

Orcesi S, Gorni K, Termine C, Uggetti C, Veggiotti P, Carrara F, Zeviani M, Berardinelli A, Lanzi G. Bilateral putaminal necrosis associated with the mitochondrial DNA A8344G myoclonus epilepsy with ragged red fibers (MERRF) mutation: an infantile case. *J Child Neurol* 2006; 21: 79-82.

Ozawa M, Goto Y, Sakuta R, Tanno Y, Tsuji S, Nonaka I. The 8,344 mutation in mitochondrial DNA: a comparison between the proportion of mutant DNA and clinico-pathologic findings. *Neuromuscul Disord*. 1995; 5: 483-488.

- Ozawa M, Nishino I, Horai S, Nonaka I, Goto YI. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: a G-to-A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tRNA(Lys) in two families. *Muscle Nerve* 1997; 20: 271-278.
- Paepe BD, Smet J, Lammens M, Seneca S, Martins J-J, Bleecker JD, Meirleir LD, Lissens W, Van Coster R. Immunohistochemical analysis of the oxidative phosphorylation complexes in skeletal muscle from patients with mitochondrial DNA encoded tRNA gene defects. *J Clin Pathol* 2009; 62: 172-176.
- 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.
- Rosing HS, Hopkins LC, Wallace DC, et al. Maternally inherited mitochondrial myopathy and myoclonic epilepsy. *Ann Neurol* 1985; 17; 228-237.
- Rossmannith W, Raffelsberger T, Roka J, Kornek B, Feucht M, Bittner RE. The expanding mutational spectrum of MERRF substitution G8361A in the mitochondrial tRNA^{Lys} gene. *Ann Neurol* 2003; 54: 820-823.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory 1989; 2:9.16-9.19.

- Santorelli FM, Mak SC, El-Schahawi M, Casali C, Shanske S, Baram TZ, Madrid RE, DiMauro S. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(lys) gene (G8363A). *Am J Hum Genet* 1996; 58: 933-939.
- Scola RH, Pereira ER, Lorenzoni PJ, Werneck LC. Toxic myopathies: muscle biopsy features. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65: 82-86.
- Seibel P, Degoul F, Bonne G, Romero N, Francois D, Paturneau-Jouas M, Ziegler F, Eymard B, Fardeau M, Marsac C, Kadenbach B. Genetic biochemical and pathophysiological characterization of a familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF). *J Neurol Sci* 1991; 105: 217-224.
- Shahwan A, Farrel M, Delanty N. Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects. *Lancet Neurol* 2005; 4: 239-248.
- 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.
- Shibasaki H. Myoclonus and startle syndromes. In: Jankovic JJ, Tolosa E. *Parkinson's disease and movement disorders*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p.291-300.
- Shibasaki H, Thompson PD. Milestones in myoclonus. *Mov Disord* 2011; 26: 1142-1148.
- Shih K-D, Yen T-C, Pang C-Y, Wei Y-H. Mitochondrial DNA mutation in a Chinese family with myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 1109-1116.
- Shtilbans A, Shanske S, Goodman S, Sue CM, Bruno C, Johnson TL, Lava NS, Waheed N, DiMauro S. G8363A mutation in the mitochondrial DNA transfer ribonucleic acidLys gene: another cause of Leigh syndrome. *J Child Neurol* 2000; 15: 759-761.

- Shoffner JM, Lott MT, Lezza A, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 1990; 61: 931-937.
- Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1179-1186.
- 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.
- Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, DiMauro S. A new mtDNA mutation in the tRNA-lys gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1213-1217.
- Sinha S, Satishchandra P, Gayathri N, Yasha TC, Shankar SK. Progressive mioclonic epilepsy: a clinical, electrophysiological and pathological study from South India. *J Neurol Sci* 2007; 252: 16-23.
- So N, Berkovic S, Andermann F, Kuzniecky R, Gendron D, Quesney LF. Myoclonus epilepsy and ragged-red fibres (MERRF). 2. Electrophysiological studies and comparison with other progressive myoclonus epilepsies. *Brain*. 1989; 112: 1261-1276.
- 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.
- Sparaco M, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E. Myoclonic epilepsy with ragged-red fibers (MERRF): an immunohistochemical study of the brain. *Brain Pathol* 1995; 5: 125-133.

- 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.
- Tanno Y, Makoto Y, Nonaka I, Tanaka K, Miyatake T, Tsuji S. Quantitation of mitochondrial DNA carrying tRNA-lys mutation in MERRF patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 880-885.
- Tanno Y, Yoneda M, Tanaka K, Kondo R, Hozumi I, Wakabayashi K, Yamada M, Fukuhara N, Ikuta F, Tsuji S. Uniform tissue distribution of tRNA(Lys) mutation in mitochondrial DNA in MERRF patients. *Neurology* 1993; 43: 1198-1200.
- Teive HA, Munhoz RP, Muzzio JA, Scola RH, Kay CK, Raskin S, Werneck LC, Bruhn H. Cerebellar ataxia, myoclonus, cervical lipomas, and MERRF syndrome. Case report. *Mov Disord* 2008; 23: 1191-1192.
- Traff J, Holme E, Ekbom K, Nilsson BY. Ekbom's syndrome of photomyoclonus, cerebellar ataxia and cervical lipoma is associated with the tRNA(Lys) A8344G mutation in mitochondrial DNA. *Acta Neurol Scand*. 1995; 92: 394-397.
- Tsairis P, Engel WK, Kark P. Familial myoclonic epilepsy syndrome associated with skeletal muscle mitochondrial abnormalities. *Neurology* 1973; 23: 408.
- Van Goethem G, Mercelis R, Lofgren A, Seneca S, Ceuterick C, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Patient homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF. *Neurology* 2003; 61: 1811–1813.

- Vila MR, Gámez J, Solano A, Playán A, Schwartz S, Santorelli FM, Cervera C, Casali C, Montoya J, Villarroya F. Uncoupling protein-1 mRNA expression in lipomas from patients bearing pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 800-802.
- Virgilio R, Ronchi D, Bordoni A, Fassone E, Bonato S, Donadoni C, Torgano G, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP. Mitochondrial DNA G8363A mutation in the tRNA Lys gene: clinical, biochemical and pathological study. *J Neurol Sci.* 2009; 281: 85-92.
- Wahbi K, Larue S, Jardel C, Meune C, Stojkovic T, Ziegler F, Lombès A, Eymard B, Duboc D, Laforêt P. Cardiac involvement is frequent in patients with the m.8344A>G mutation of mitochondrial DNA. *Neurology.* 2010; 74: 674-677.
- 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.
- 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.
- Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol* 2010; 41: 256-266.
- Yasukawa T, Kirino Y, Ishii N, Holt IJ, Jacobs HT, Makifuchi T, Fukuhara N, Ohta S, Suzuki T, Watanabe K. Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett* 2005; 579: 2948-2952.
- Yoneda M, Tanno Y, Horai S, Ozawa T, Miyatake T, Tsuji S. A common mitochondrial DNA mutation in the tRNA-lys of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem Int* 1990; 21: 789-796.
- Zeviani M, Amati P, Bresolin N, Antozzi C, Piccolo G, Toscano A, DiDonato S. Rapid detection of the A-to-G(8344) mutation of mtDNA in Italian families with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1991; 48: 203-211.
- 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 DNAm_t

Tabela 11. Características do DNA extraído de material proveniente de biópsia muscular dos pacientes com MERRF.

| Caso | Quantidade (ug/ul) | Relação 260 / 280 |
|------|-----------------------|----------------------|
| 1 | 64,5 | 1,91 |
| 2 | 81,2 | 1,95 |
| 3 | 50,3 | 1,82 |
| 4 | 66,5 | 1,90 |
| 5 | 73,0 | 1,91 |
| 6 | 90,5 | 1,77 |