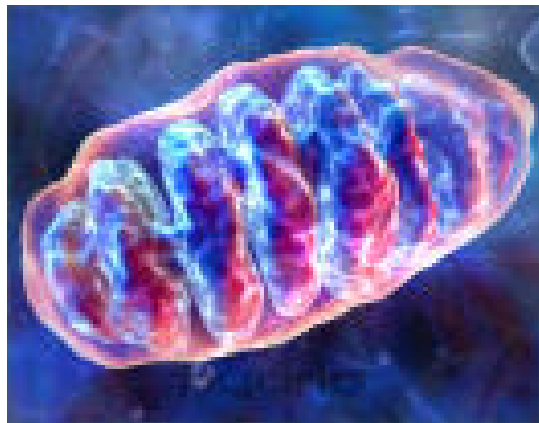


UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

UM ESTUDO CLÍNICO, BIOQUÍMICO, HISTOQUÍMICO E  
GENÉTICO-MOLECULAR DE PACIENTES COM DOENÇAS DO  
DNA MITOCONDRIAL



*Carolina Fischinger Moura de Souza*

Porto Alegre, Fevereiro de 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

UM ESTUDO CLÍNICO, BIOQUÍMICO, HISTOQUÍMICO E  
GENÉTICO-MOLECULAR DE PACIENTES COM DOENÇAS DO  
DNA MITOCONDRIAL

*Carolina Fischinger Moura de Souza*

*Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como  
requisito parcial para obtenção do grau de Doutor  
em Ciências.*

**Orientador:** Prof. Roberto Giugliani  
**Co-orientadora:** Profa. Maria Luiza Saraiva Pereira

Porto Alegre, Fevereiro de 2005.

## **Instituições e Fontes Financiadoras**

Esta tese foi desenvolvida no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de novembro de 2001 a fevereiro de 2005, sob a orientação do Prof. Dr. Roberto Giugliani e a co-orientação da Profa. Dra Maria Luiza Saraiva Pereira. Durante a realização dos trabalhos contamos com a colaboração financeira do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) e do Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT).

*Que Deus me Conceda  
a serenidade de aceitar as coisas que não posso mudar  
a coragem para mudar as coisas que posso mudar  
e a sabedoria para distinguir a diferença*

*Elisabeth Kübler-Ross, M.D  
(do livro A Roda da vida)*

**Aos pais e aos meus queridos pacientes:  
-Posso dizer que aprendi muito mais com vocês do que consegui ensinar.**

**Francisca**, minha linda princesa, ainda pequenina. Tudo isso foi difícil, mas agora passou. Espero que um dia você possa entender que o esforço foi também por você. Vamos brincar?

**Thomas**, sem você, nada disso seria possível ou teria sentido. Você é o verdadeiro companheiro dos bons e maus momentos. Obrigada pela vida maravilhosa que tenho, todos os dias, ao teu lado.

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador **Prof. Roberto Giugliani**, pelo constante apoio, por todas as oportunidades e pela permanente confiança no meu trabalho. É uma pessoa que tem, e sempre terá, a minha admiração por tudo que desenvolve no campo da ciência, trabalho e relacionamento humano.
- À minha co-orientadora, amiga, **Profa. Maria Luiza Saraiva Pereira**, por ter sido a peça fundamental de todo esse trabalho:

*“Há três métodos para ganhar a sabedoria: o primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; o segundo, por imitação, que é o mais fácil; e o terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”*

Confúcio.

- Aos meus pais que, durante toda a minha vida, deixaram as portas abertas para o meu constante aprendizado e me forneceram todo embasamento intelectual que me permitiu hoje seguir no caminho do aprendizado constante. Além disso, estiveram sempre ao meu lado dando apoio, amor e carinho.
- À Letícia Laybauer pela amizade, pela disposição em sempre ajudar e pela competência e presteza em desempenhar as técnicas laboratoriais.
- À Bianca Machado da Cruz, pelo auxílio no laboratório e pela grande “mão quente”.
- À sempre amiga Ida Vanessa Schwartz, inspiração dos meus conhecimentos e sempre companheira.
- Às meus colegas de trabalho, Patrícia Prolla, Têmis Félix, Ricardo Pires, Julio Leite, e em especial à Ana Cristina Puga e Maria Teresa Sanseverino.
- Ao pessoal do laboratório de patologia experimental do Centro de Pesquisa Biomédica do HCPA: Neiva Copetti e Jorge Lopes.
- À Rossana Mizunski Peres pelo auxílio na análise estatística e apoio.
- À Silvia Brustolin, por todo auxílio operacional, principalmente, nos momentos mais críticos.
- À Profa Lavínia Schüller Faccini por ser sempre uma pessoa positiva e continuar sendo uma pessoa importante na minha vida acadêmica.

- Aos médicos que colaboraram com este estudo: Profa. Sandra Silveira, Dr. Luiz Felipe Rocha Vasconcelos, Dr. Ricardo Pires, Dra. Simone Karam, Dra Fernanda Roth, Dra Fabiana Hauser, Dr. Gustavo Megawa, Dr. Paulo Baes, Dra Márcia Puñales e Dra Priscila Bernardi e outro que estiveram direta ou indiretamente envolvidos com os pacientes que apresentam doença mitocondrial.
- Aos colegas e amigos do Serviço de Patologia Clínica do HCPA, em especial ao Prof. Ricardo Machado Xavier pelo incentivo e apoio.
- Aos órgãos financiadores desta pesquisa (CNPQ, CAPES, PRONEX, FIPE/HCPA)

## **ESTRUTURA**

Após o item Introdução, esta tese apresenta três artigos científicos submetidos à publicação. Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se nos próprios artigos. As Referências Bibliográficas de cada artigo aparecem no formato dos periódicos aos quais foram submetidos.

O item Discussão contém interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos apresentados e sobre o conjunto de resultados obtido neste trabalho. O item Conclusões contém as conclusões gerais da tese.

Os itens Lista de Abreviaturas e Siglas, Lista de Figuras, Lista de Tabelas e Referência Bibliográfica referem-se somente às citações que aparecem no texto da tese, e não às que aparecem nos artigos.

O item Anexos contém dados adicionais referentes ao conteúdo desta tese, cuja inclusão foi considerada relevante.



# SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviaturas e Siglas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>xv</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xix</b>
<b>Capítulo I</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1. Histórico.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2. A estrutura da mitocôndria.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3. A função da mitocôndria.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4. O genoma mitocondrial.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5. A herança mitocondrial.....</b>	<b>31</b>
<b>1.6. A origem e a patogênese das mutações do mtDNA.....</b>	<b>32</b>
<b>1.7. Classificação das doenças mitocondriais.....</b>	<b>34</b>
<b>1.8. Apresentação Clínica.....</b>	<b>37</b>
1.8.1. Idade de início.....	37
1.8.2. Características gerais.....	38
1.8.3. Alguns fenótipos e síndromes específicas.....	40
<b>1.9. Diagnóstico.....</b>	<b>44</b>
1.9.1. Triagem bioquímica.....	45
1.9.2. Atividade bioquímica das enzimas da CRM.....	46
1.9.3. Estudo histoquímico.....	48
1.9.4. Análise molecular.....	49
<b>1.10. Aconselhamento Genético.....</b>	<b>52</b>

1.11. Diagnóstico Pré-Natal.....	53
1.12. Tratamento.....	54
1.13. Frequência.....	56
1.14. Frequência em nosso meio.....	56
1.14. Justificativas.....	57
1.15. Objetivos.....	58
<b>Capítulo II</b>	
<b>DIAGNOSIS OF MITOCHONDRIAL DISORDERS: APPLICATION OF A DNA-BASED PROTOCOL IN SELECTED PATIENTS.....</b>	<b>60</b>
<b>Capítulo III</b>	
<b>QUANTITATIVE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA DELETION BY REAL-TIME PCR: APLICATION TO DIAGNOSIS OF MITOCHONDRIAL DISORDERS....</b>	<b>87</b>
<b>Capítulo IV</b>	
<b>CONVENTIONAL MRI AND MR SPECTROSCOPY IN NON-CLASSIC MITOCHONDRIAL DISEASE: REPORT OF THREE PATIENTS WITH MITOCHONDRIAL DNA DELETION.....</b>	<b>106</b>
<b>Capítulo V</b>	
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>120</b>
5.1. Delineamento do estudo.....	120
5.2. Amostra estudada.....	120
5.3. Investigação clínico-laboratorial: comentário geral sobre o protocolo utilizado.....	121
5.4. Características dos pacientes com e sem mutação no mtDNA.....	124
5.5. O emprego da variável “alta probabilidade” e “baixa probabilidade”.....	126
5.6. Achados histoquímicos.....	126
5.7. O uso do PCR em tempo real para estimar a percentagem relativa de deleções no mtDNA.....	127
5.8. Achados de neuroimagem.....	128

**Capítulo VI**

**6. CONCLUSÕES..... 131**

**Capítulo VII**

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 136**

**ANEXOS**

- I. Ficha de avaliação clínica**
- II. Termo de consentimento informado**
- III. Protocolos de análise molecular**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AVC</b>	Acidente vascular cerebral
<b>C</b>	Citosina
<b>Ca</b>	Cálcio
<b>CG/MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
<b>CRM</b>	Cadeia respiratória mitocondrial
<b>COX</b>	Coenzima c oxidase
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>EEG</b>	Eletroencefalograma
<b>ETF</b>	Flavoproteína transferidora de elétrons ( <i>electron transport flavoprotein</i> )
<b>ENMG</b>	Eletroneuromiografia
<b>FAD</b>	Adenina-flavina dinucleotídeo (forma oxidada) ( <i>flavin adenine dinucleotide</i> )
<b>FADH</b>	Adenina-flavina dinucleotídeo (forma reduzida)
<b>G</b>	Guanina
<b>GH</b>	Hormônio de crescimento ( <i>growth hormone</i> )
<b>H</b>	Hidrogênio
<b>KSS</b>	Síndrome de Kearns Sayre ( <i>Kearns Sayre syndrom</i> )
<b>LHON</b>	Atrofia óptica hereditária de Leber ( <i>Leber hereditary optic atrophy</i> )
<b>L/P</b>	Relação lactato-piruvato
<b>MELAS</b>	Encefalopatia, acidose láctica, episódios de acidente vascular cerebral ( <i>mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes</i> )
<b>MERRF</b>	Epilepsia mioclônica com fibras rotas vermelhas ( <i>myoclonus epilepsy with ragged red fibres</i> )
<b>MNGI</b>	Mio-neuro-gastro-intestinal ( <i>myo-neuro-gastro-intestinal encephalopathy</i> )
<b>mmol</b>	Milimol
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro

<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>NAD</b>	Adenina-nicotinamida dinucleotídeo (forma oxidada) ( <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
<b>NADH</b>	Adenina-nicotinamida dinucleotídeo (forma reduzida)
<b>NARP</b>	Neuropatia ataxia e retinite pigmentar
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>NIDDM</b>	Diabete <i>mellitus</i> insulino dependente
<b>OXPHOS</b>	Fosforilação oxidativa ( <i>mitochondrial oxidative phosphorylation system</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase ( <i>polimerase chain reaction</i> )
<b>PEO</b>	Oftalmoplegia externa progressiva ( <i>progressive external ophthalmoplegia</i> )
<b>PEV</b>	Potencial evocado visual
<b>PEA</b>	Potencial evocado auditivo
<b>RFLP</b>	Polimorfismo do comprimento de fragmento de restrição ( <i>restriction fragment length polymorphisms</i> )
<b>RNM</b>	Ressonância nuclear magnética
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>RRF</b>	Fibra rota vermelha ( <i>ragged red fibre</i> )
<b>SDH</b>	Succinato desidrogenase ( <i>succinate dehydrogenase</i> )
<b>SL</b>	Síndrome de Leigh ( <i>Leigh syndrom</i> )
<b>SSCP</b>	Análise de polimorfismos conformacionais em fita única de DNA ( <i>single-stranded conformational polymorphism analysis</i> )
<b>T</b>	Timina
<b>TC</b>	Tomografia de crânio
<b>tRNA</b>	RNA transportador

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Estrutura da mitocôndria	26
<b>2</b>	Complexos da cadeia respiratória mitocondrial	28
<b>3</b>	Representação esquemática das funções da mitocôndria	28
<b>4</b>	O genoma mitocondrial humano	29
<b>5</b>	Representação da segregação mitótica aleatória	33
<b>6</b>	Fenótipo clínico de pacientes com doença mitocondrial	42
<b>7</b>	Fenótipo muscular das doenças mitocondriais	49
<b>8</b>	Genoma mitocondrial com a localização de algumas mutações patogênicas	50
<b>9</b>	Fluxograma de avaliação de paciente com suspeita de doença mitocondrial	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Cadeia respiratória mitocondrial	27
<b>2</b>	Particularidades do mtDNA	31
<b>3</b>	Classificação genética das mitocondriopatias	35
<b>4</b>	Principais síndromes mitocondriais	36
<b>5</b>	Principais características das doenças mitocondriais	39
<b>6</b>	Investigação diagnóstica em pacientes com suspeita de doença mitocondrial	45
<b>7</b>	Cofatores utilizados no tratamento das doenças mitocondriais	55
<b>8</b>	Características clínicas das doenças mitocondriais	125

## RESUMO

**Introdução:** As doenças mitocondriais apresentam características heterogêneas devido à própria natureza e função da mitocôndria, que possui o seu próprio DNA (mtDNA). A disfunção mitocondrial pode afetar um único órgão ou ser uma doença multissistêmica, de manifestação na infância ou na vida adulta, podendo ter um padrão de herança materna ou mendeliana. O diagnóstico é complexo e requer uma investigação criteriosa, passo-a-passo, com atenção a história clínica, exames laboratoriais, neuroimagem e, muitas vezes, a biópsia muscular para análise histoquímica, bioquímica e genética. A análise molecular é fundamental na definição do diagnóstico e os protocolos propostos até o momento são, geralmente, direcionados para um grupo de pacientes com características clínicas homogêneas.

**Objetivos:** os objetivos deste trabalho foram: a) propor um protocolo combinando dados clínicos e laboratoriais para indicar a melhor forma de investigação molecular de pacientes com suspeita clínica de doença do DNA mitocondrial, b) Comparar os achados clínicos e laboratoriais nos pacientes com e sem mutação no mtDNA, c) avaliar quais são os fatores clínicos preditivos de mutação no mtDNA que podem ser utilizados como sinalizadores para o médico decidir quando deve ser realizado um procedimento diagnóstico invasivo e de alto custo, c) estimar a proporção de mtDNA mutado, através da técnica PCR em tempo real em um grupo de pacientes com deleção, correlacionando com a idade de início dos sintomas e gravidade de manifestações clínicas, d) relatar achados de RNM com espectroscopia por emissão de prótons em pacientes com deleção no mtDNA.

**Pacientes, material e métodos:** Foram selecionados, no ambulatório de doenças mitocondriais do HCPA, 43 pacientes com suspeita clínica de doença mitocondrial. Esses pacientes foram submetidos à análise, por etapas, de 5 mutações de ponto no mtDNA de leucócitos, de deleção no mtDNA de músculo e ao sequenciamento do tRNA<sup>leu</sup> e tRNA<sup>lys</sup>. Os pacientes com resultados positivos e negativos para mutações do mtDNA foram então comparados em relação às suas características clínicas e laboratoriais.



Foram selecionados 11 pacientes para a determinação da percentagem relativa de deleção do mtDNA no tecido muscular e 3 pacientes para a descrição da RNM com espectroscopia.

**Resultados** – Foram encontradas mutações no mtDNA em 17 pacientes (39.9%) distribuídas da seguinte forma: 4 pacientes com MELAS (A3243G), 1 paciente com síndrome de Leigh (T8993C) e 12 pacientes com deleções no mtDNA. As características significativamente mais frequentes no grupo de pacientes com mutação no mtDNA comparados com os demais foram: miopia ( $p=0,032$ ), retinopatia pigmentar ( $p=0,007$ ), oftalmoplegia e ptose ( $p=0,002$ ), baixa estatura ( $p=0,04$ ), hipotrofismo ( $p=0,033$ ) e acidose láctica ( $p=0,006$ ). A quantificação do mtDNA pela técnica de PCR em tempo real foi realizada em 11 amostras de músculo de pacientes com deleção no mtDNA e com diferentes manifestações clínicas. Não houve correlação entre a percentagem relativa de deleção no mtDNA com os fenótipos clínicos (PEO, KSS e encefalomiopatia associado à doença multissistêmica), bem como com a idade de início das manifestações clínicas. A RNM com espectroscopia por emissão de prótons realizada em três pacientes com deleção no mtDNA associada a um quadro clínico não clássico mostrou achados distintos para cada paciente, sendo comum a todos as lesões cerebrais e a presença do pico invertido de lactato.

**Conclusões** - A criteriosa seleção clínica e laboratorial se mostrou apropriada e o protocolo empregado se mostrou eficiente, uma vez que a mutação no mtDNA pode ser detectada em 17 dos 43 pacientes com suspeita de doença mitocondrial. Os pacientes positivos para deleção no mtDNA apresentaram algumas características clínicas preditivas para doença do mtDNA, o que pode ser importante na indicação de um procedimento invasivo (biópsia muscular) e de alto custo. A técnica de PCR em tempo real pode ser utilizado para quantificar a percentagem relativa de mtDNA deletado, porém para o diagnóstico das deleções, essa técnica deve ser realizada de forma complementar à técnica tradicional (*Southern blot*). O número amostral ainda é pequeno para correlacionar a quantidade relativa de mtDNA deletado com as síndromes mitocondriais clássicas e não clássicas. A RNM com espectroscopia por emissão de prótons, por possibilitar a detecção do lactato cerebral, parece ter utilidade na avaliação

clínica de pacientes com suspeita clínica de doença mitocondrial, mesmo quando o quadro não é clássico.

**Palavras Chave:** Doença mitocondrial, DNA mitocondrial, Deleção do DNA mitocondrial, Diagnóstico de doença mitocondrial.

## ABSTRACT

**Introduction:** Mitochondrial diseases show heterogeneous clinical characteristics due to the intrinsic nature and function of mitochondria, which have their own DNA (mtDNA). Mitochondrial dysfunction may affect a single organ, or present as a multisystemic disorder, they may manifest themselves in infancy, childhood or during adult life, with patterns of inheritance that can be mendelian or maternal. The diagnostic process is complex, requiring a judicious, step-by-step investigation with particular attention to clinical history, biochemical testing, neuroimaging and, in many circumstances, a muscle biopsy in order to provide histochemical, biochemical and genetic information. Molecular analysis is paramount to define diagnosis, the investigational protocols, however, are usually directed to groups of patients with homogeneous clinical pictures.

**Objectives:** The goals of the study were: a) to propose an investigational protocol combining clinical and laboratorial data to better qualify the molecular investigation of patients with suspected mitochondrial DNA disorders, b) to compare clinical and laboratorial information on patients with and without mtDNA mutations, c) to investigate the best clinical factors predicting a mtDNA mutation, which can be used as flags for the physician when considering an invasive and expensive diagnostic procedure, d) to estimate the proportion of mutated mtDNA, using real time PCR, in a group of patients with mitochondrial deletions, as a tentative correlation with age of onset and severity of clinical manifestations, e) to report magnetic resonance imaging (MRI) and magnetic resonance spectroscopy (MRS) findings in patients with mtDNA deletions.

**Patients, materials and methods:** We selected 43 patients with suspected mitochondrial disorders from the Clinic of Mitochondrial Disorders at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. These patients underwent, in a stepwise fashion, investigation for 5 mtDNA point mutation in leucocytes, mtDNA deletions in muscle, and sequencing of tRNA<sup>leu</sup> e tRNA<sup>lys</sup>. Patients positive or negative for mtDNA mutations were then compared in terms of their clinical and laboratorial characteristics. Eleven patients with mtDNA

deletions were selected for mutation quantification on muscle, and 3 additional patients were selected for MRI and MRS analysis.

**Results:** We found mtDNA mutations in 17 patients (39.9%): 4 cases of MELAS (A3243G), 1 patient with Leigh syndrome (T8993C), and 12 patients with mtDNA deletion. The most frequent, and statistically significant, characteristics in the group of mtDNA deletion, when compared to the other groups, were: myopathy ( $p=0.032$ ), pigmentary retinopathy ( $p=0.007$ ), ophthalmoplegia and ptosis ( $p=0.002$ ), short stature ( $p=0.04$ ), hypotrophism ( $p=0.033$ ), and lactic acidosis ( $p=0.006$ ). Quantification of mtDNA, using real time PCR, was performed on 11 muscle samples from patients with mtDNA deletion and diverse clinical manifestations. No correlation was found between relative percentage of deleted mtDNA, and clinical phenotypes (PEO, KSS and encephalopathy associated to multisystemic disease), or age of onset. Real time PCR shows good sensitivity on relative quantification of deleted mtDNA. Its applicability is, however, compromised in patients with multiple mtDNA deletions. MRI and MRS investigation on 3 patients with mtDNA deletion and non-classical clinical pictures showed distinct results for each patient. Cerebral lesion and an inverted lactate peak were present in all patients.

**Conclusions:** Judicious clinical and laboratorial assessment proved adequate, and the applied protocol, efficient, since mtDNA mutations were detected in 17 out of 43 patients with clinical suspicion of mitochondrial disorders. Patients positive for mtDNA deletion showed some clinical characteristics predictive of mtDNA disease, a finding that can be important when considering an expensive and invasive procedure, such as a muscle biopsy. Real time PCR can be used to quantify the relative percentage of deleted mtDNA. For deletion diagnosis, however, it must be applied as a complementary method to traditional Southern blotting. Our sample size is small to explore a correlation between relative quantity of deleted mtDNA and classical mitochondrial syndromes or encephalopathies associated with multisystemic disorders. MRS, since it enables detection of cerebral lactate, seem to be of clinical relevance in the investigation of patients suspected of mitochondrial diseases, even when presenting with non-classical clinical pictures.

**Key Words:** Mitochondrial disorders, Mitochondrial DNA, deletions of mitochondrial DNA, Diagnosis of mitochondrial disorders.

# Capítulo I

## 1- INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

As mitocondriopatias são causadas por mutações esporádicas ou espontâneas nos genes codificadores para proteínas que podem ser enzimáticas, sinalizadoras, carreadoras, receptoras, de choque térmico, RNA transportador (tRNA), RNA ribossômico (rRNA) ou propriamente estruturais do DNA mitocondrial (mtDNA) ou DNA nuclear (nDNA). Além disso, podem também ser causada por agressões exógenas como drogas, toxinas or infecções (Morgan-Hughes, 1994; Schapira, 1998; DiMauro e Schon, 2001). As proteínas mais freqüentemente afetadas pelas mutações no mtDNA ou nDNA são as da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) e da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Por isso, o termo mitocondriopatias vem sendo utilizado como sinônimo de doença da CRM. Contudo, as mitocondriopatias podem ser causadas por defeitos em rotas metabólicas e outros componentes que não envolvem diretamente a atividade da CRM ou OXPHOS.

As doenças mitocondriais caracterizam-se por serem um grupo de doenças com um amplo espectro de manifestações clínicas e de sobreposição de diferentes características (Leonard e Schapira, 2000). Deve-se considerar que no mtDNA uma simples mutação ou diferentes mutações no mesmo gene podem se manifestar clinicamente de forma muito distinta; por outro lado, um mesmo fenótipo clínico pode ser causado por diferentes mutações (heterogeneidade genética) (DiMauro, 2001; Zeviani e Carelli, 2003). A luz dos conhecimentos atuais, o objetivo a partir daqui é descrever os atuais conhecimentos da genética em relação às patologias mitocondriais.

### **1.1. Histórico**

Há mais de um bilhão de anos atrás, uma bactéria aeróbica colonizou uma célula eucariótica primordial que não apresentava possibilidade metabólica para a utilização do oxigênio. Desenvolveu-se, a partir deste momento, uma relação simbiótica e permanente, permitindo a substituição da glicólise anaeróbica pelo metabolismo aeróbico, uma forma muito mais

eficiente de geração de energia pela célula (Wallace e cols., 1999; DiMauro e Schon, 2003).

O termo mitocôndria (*mitos* – linha e *chondros* – grânulos) foi introduzido por Brenda em 1898, entretanto a presença destes grânulos ou “bioblastos” já era conhecida há 40 anos. Kölliker havia descrito esta organela em 1856 e Altmann, em 1880, iniciou os estudos da sua estrutura e função na célula. Porém, somente em 1946, a mitocôndria foi reconhecida como a principal região celular responsável pelo metabolismo energético. Através de um estudo envolvendo uma série de pesquisadores, atualmente famosos, como Warbug, Keilin, Krebs, Kalckar, Belister e Lehninger, as principais etapas do metabolismo energético foram sendo desvendadas nos anos 50 (Dahl e Thorburn, 2001).

As doenças mitocondriais foram inicialmente descritas por Kearns e Sayre (1958) e logo após por Ernster (1959) e Luft (1962) (doença de Luft’s) (Kearns e Sayre, 1958; Ernster e cols., 1959; Luft e cols., 1962). Em 1963, o mtDNA foi descoberto. Em 1974 foi constatado que os genes do mtDNA codificavam proteínas que eram componentes da CRM. Em 1980, ficou claro que a transmissão do mtDNA era pela linhagem materna. Anderson e cols. (1981), publicaram o seqüenciamento completo do genoma mitocondrial (Anderson e cols., 1981). Em 1984, foi descoberto que alguns componentes da CRM eram codificados por genes nucleares e não mitocondriais. Em 1986, todos os 13 produtos gênicos da CRM codificados pelo mtDNA foram estudados em detalhes. A primeira mutação no mtDNA foi descrita somente em 1988 (Holt e cols., 1988; Wallace e cols., 1988). Em 1992, a primeira mutação nuclear causando um mitocondriopatia foi detectada (Burgeois e cols., 1992). Atualmente mais de 100 mutações de ponto no mtDNA e mais de 20 no nDNA são conhecidas como causas primárias ou secundárias de doença mitocondrial (<http://www.mitomap.org>).

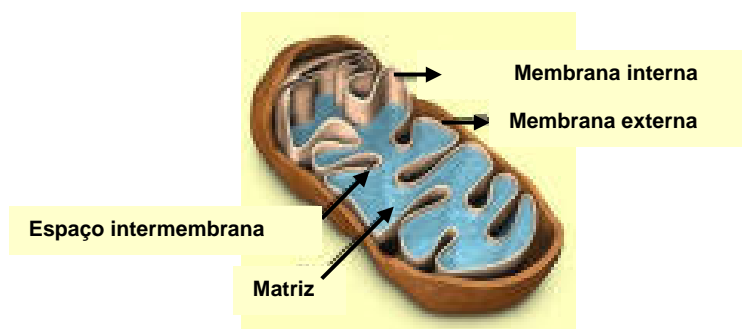
## **1.2. A estrutura da mitocôndria**

A mitocôndria está presente no citoplasma de todas as células eucarióticas dos animais e plantas superiores, e, também, em alguns



microrganismos (algas, fungos e protozoa). A mitocôndria humana é uma organela esferóide ou ovóide com diâmetro transversal de 0,1-0,5 $\mu$ m e um comprimento variável (Finsterer, 2004). Evidências sugerem que a mitocôndria é originária de um microrganismo procarioto que passou a ter uma relação simbiótica com a célula em algum momento do período evolucionário, integrando-se a esta e mantendo, até o presente, algumas características próprias (Wallace e cols., 1999). O número de mitocôndrias por célula varia de nenhuma (eritrócitos) até 10.000 (músculo estriado). A média aproximada no organismo humano é de 500-2.000/célula. O número de mitocôndrias pode aumentar conforme a demanda do substrato e a utilização do oxigênio por uma determinada célula ou tecido (Finsterer, 2004). Dentro do tecido muscular, a mitocôndria localiza-se entre as miofibrilas, região subsarcolemal, próximo ao núcleo e a placa motora. A mitocôndria é composta por quatro compartimentos: **(i)** membrana externa, **(ii)** membrana interna, **(iii)** espaço intermembrana e **(iv)** matriz (figura 1).

- i. Membrana externa: constituição lipídica e permeável a moléculas menores que 10.000 Da. Sua função é permitir a entrada de proteínas do citoplasma para dentro da mitocôndria.
- ii. Membrana interna: Constituída por 70% de proteína, onde estão localizados cinco complexos da CRM, a ubiquinona e a carnitina palmitoil transferase II (Chinnery e cols., 1999; Chinnery e Schon, 2003) (McFarland e cols., 2002). O transporte de substrato via membrana interna é seletivo, sendo permeável somente para moléculas como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Neste espaço há também os carreadores de ânions, cátions e substâncias redutoras, como o aspartato/glutamato, o citrato/malato,  $\alpha$ -cetoglutarato/malato, a carnitina, o piruvato, entre outros.
- iii. Espaço Intermembranas: Concentram-se algumas proteínas como a creatina-fosfoquinase, a proteína para distonia e surdez e outras relacionadas à apoptose celular.
- iv. Matriz: Local onde se encontram as proteínas e enzimas do ciclo de Krebs, parte dos complexos da CRM, as DNAs polimerases, os tRNAs, os RNAs mensageiros (mRNAs), as chaperonas (proteínas de choque térmico) e, finalmente, o mtDNA.



**Figura 1** – Estrutura da mitocôndria

### **1.3. A função da mitocôndria**

Sabe-se que a mitocôndria é composta por mais de 1.000 proteínas diferentes. Portanto, pode-se estimar que as proteínas mitocondriais representem aproximadamente 3% de todas as proteínas celulares (levando-se em conta a recente estimativa de que o genoma humano contém aproximadamente 30.000 genes). A grande maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo núcleo, traduzida no citoplasma e transportada até o interior da mitocôndria. Pelo que se conhece atualmente da biogênese mitocondrial, podemos concluir que ocorre uma complexa comunicação entre a mitocôndria, o citosol e o núcleo celular.

A mitocôndria exerce quatro funções biológicas fundamentais no nosso organismo, definidas como, a produção de adenosina trifosfato (ATP), a mediação da morte celular programada (apoptose), a produção de calor e, finalmente, sua importante contribuição na genética humana através do mtDNA (Finsterer, 2004).

A produção de ATP é a principal função da mitocôndria, que tem sido apropriadamente denominada de “casa de força” da célula. Toda a energia liberada da oxidação dos carboidratos, gorduras e proteínas é disponibilizada na forma de equivalentes reduzidos (prótons e elétrons) para dentro da cadeia respiratória, onde são transferidos através de um de gradiente eletro-químico, para a transformação de oxigênio em água e adenosina difosfato (ADP) em ATP (Ernster, 1984). A CRM é organizada em

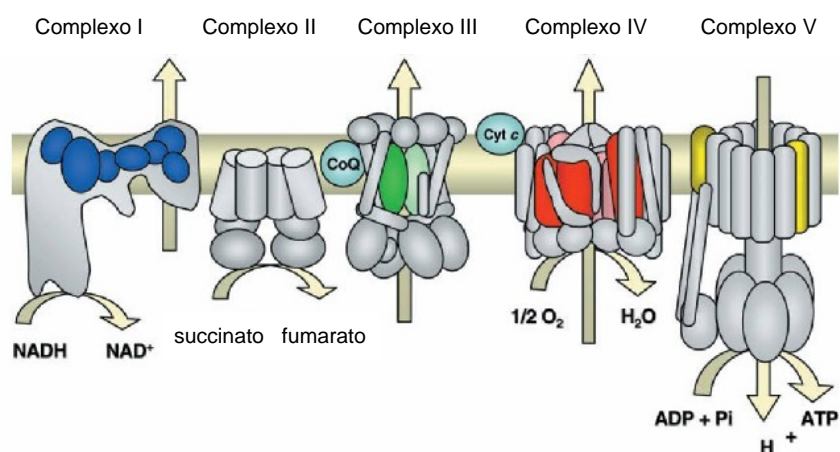
cinco complexos enzimáticos compostos por 83 polipeptídeos, dos quais 70 são codificados pelo nDNA e 13 pelo mtDNA (tabela 1).

**Tabela 1** Cadeia respiratória mitocondrial

Complexo	Nomenclatura	NTS	Subunidades nDNA	Subunidades mtDNA
I	NADH coenzima Q oxido-redutase	41	34	7 (ND1,ND2,ND3,ND4, ND4L, ND5,ND6)
II	succinato desidrogenase-CoQ oxido-redutase	4	4	0
III	coenzima Q citocromo C oxido redutase	11	10	1 (citocromo b)
IV	citocromo c oxidase (COX)	13	10	3 (COX1, COX2,COX3)
V	ATP sintase	14	12	2 (ATPase 6 e 8)

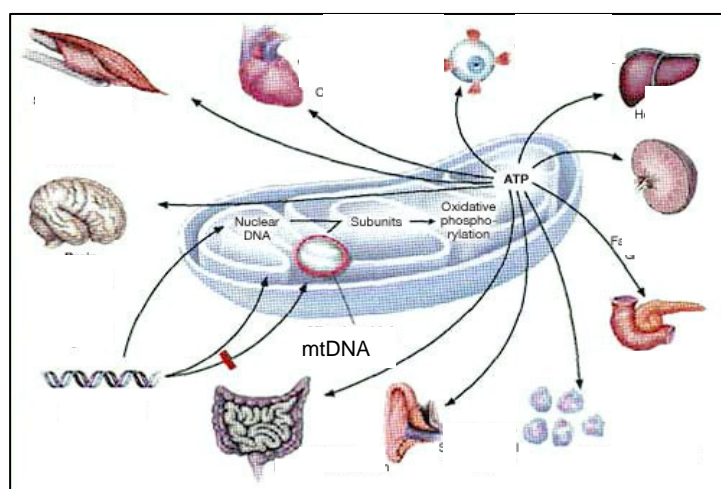
NTS: número total de subunidades

O complexo I recebe elétrons do NADH; o complexo II recebe elétrons do succinato; enquanto os complexos III e IV recebem elétrons do NADH, do succinato e do FADH<sub>2</sub>. O NADH e o succinato são produtos intermediários da rota do ciclo de Krebs, enquanto o FADH<sub>2</sub> é proveniente da rota da β-oxidação dos ácidos graxos via a flavoproteína transferidora de elétrons (ETF) e o sistema ETF-coenzima Q oxiredutase. A coenzima Q é uma quinona altamente hidrofóbica e o citocromo C é uma proteína de baixo peso molecular; estes compostos movimentam-se entre os complexos carreando elétrons. A energia livre gerada através das reações de redução é utilizada para bombear prótons da matriz para o espaço intermembrana, pelos complexos I, II e IV, gerando um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. O fluxo de prótons entra no complexo V (ATP sintase) para finalmente ocorrer a síntese de ATP. Para cada molécula de NADH oxidada são sintetizadas 3 moléculas de ATP (Leonard e Schapira, 2000) (figura 2).



**Figura 2-** Complexos da cadeia respiratória mitocondrial

Pode-se assim deduzir que todo este complexo mecanismo de geração de energia celular deve funcionar em perfeita harmonia para que o organismo tenha energia suficiente ao suprimento dos mais diversos órgãos e tecidos do nosso corpo. Como consequência do mau funcionamento da rota metabólica da produção energética, temos, teoricamente, a manifestação dos mais diversos sinais e sintomas clínicos, envolvendo qualquer órgão ou tecido, afetando qualquer idade e envolvendo os mais diversos modos de herança, já que os complexos da CRM são codificados por dois genomas: o nuclear e o mitocondrial (Munnich e Rustin, 2001) (figura3).



**Figura 3-** Representação esquemática das funções da mitocôndria



---

Ao contrário do genoma nuclear, o mtDNA é compacto e os seus genes não possuem introns. O mtDNA contém 37 genes que codificam 13 proteínas (13 mRNA) da cadeia respiratória, 22 tRNAs e 2 rRNAs, a subunidade 23S e a subunidade 16S do rRNA. O código genético mitocondrial, usado para decifrar somente 13 mRNAs diferentes no ribossomo mitocondrial, difere em alguns aspectos do código genético nuclear. Há somente 22 moléculas diferentes de tRNA que são capazes de interpretar diferentes códons. Oito das 22 moléculas de tRNA possuem anticódons que são capazes de reconhecer famílias de 4 códons diferentes, somente pela terceira base, e 14 reconhecem códons que são idênticos nas primeiras duas posições e trocam por uma purina ou pirimidina na terceira posição. Portanto, 22 moléculas de tRNA mitocondrial podem reconhecer o total de 60 códons . O restante, UAG, UAA, AGA e AGG, não é reconhecido, constituindo códigos de parada (Wallace e cols., 1999). Dos 37 genes do mtDNA, 24 são necessários na tradução, a maior parte dos 1000 produtos gênicos mitocondriais são codificados pelo nDNA e importados para dentro da mitocôndria. Portanto, o mtDNA depende do nDNA para replicação, transcrição, tradução e reparo. Além disso, durante o desenvolvimento, a mitocôndria divide e prolifera sob controle de genes nucleares (Zeviani e Di Donato, 2004) (tabela 2).

---

**Tabela 2** Particularidades do mtDNA

---

Circular e compacto
Possui seu próprio aparato para replicação, transcrição e tradução
Ausência de introns
Sobreposição de alguns genes
Somente uma região promotora
Taxa de mutação 10 vezes maior do que no nDNA
Exposto permanentemente ao estresse oxidativo da CRM
Ausência de histonas (protetoras)
Ausência de mecanismos de reparo
Transmissão materna e ausência de recombinação
Polimorfismos freqüentes
Diferente código genético
RNA autocatalítico (RNA com atividade enzimática)

---

### **1.5. A herança mitocondrial**

De uma forma geral, todas as mitocôndrias (e todo mtDNA) do zigoto, derivam do óvulo. Recentes evidências de transmissão paterna do mtDNA em tecido muscular de um paciente com miopatia mitocondrial demonstram que a herança materna não é uma regra absoluta, mas não devemos negar a sua primazia, pois, em geral, todo mtDNA paterno que consegue penetrar no ovócito sofre a ação de enzimas proteolíticas até a sua degradação completa (Schwartz e Vissing, 2002; Williams, 2002). Assim sendo, a maioria das mutações no mtDNA tem associação com uma herança materna, ou seja, as mães transmitem a deficiência para toda a sua descendência, mas somente as suas filhas transmitirão a doença para a geração seguinte.

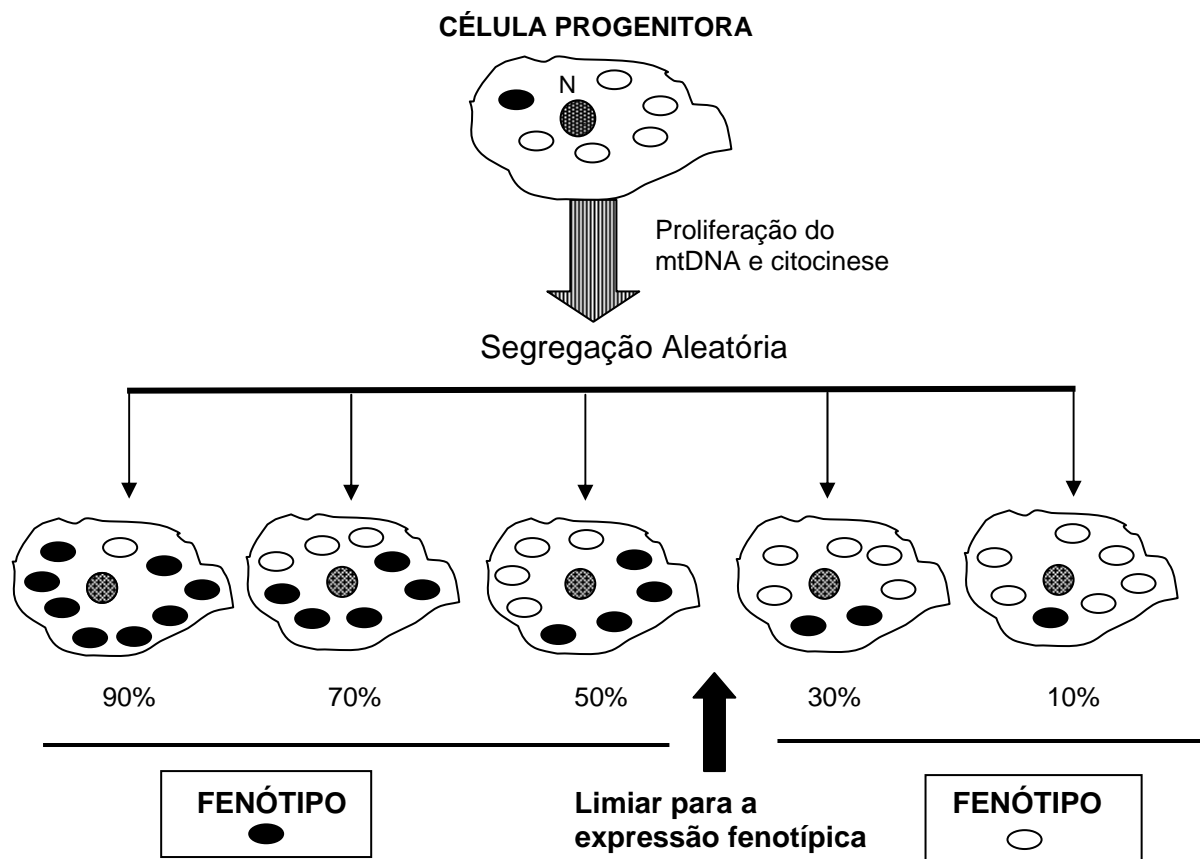
Sabe-se que, precocemente, no período de desenvolvimento da linhagem germinativa feminina, o número de moléculas de mtDNA contida em cada ovócito sofre uma dramática redução antes de sua subsequente amplificação, para chegar ao final com um número aproximado de 100.000

em cada ovócito maduro. Esta primeira restrição, e posterior amplificação, também chamada de “efeito gargalo de garrafa”, leva a uma desproporção e formação de diferentes tipos de mtDNA na prole de uma mulher com mutação no mtDNA (Schapira e Cock, 1999; Leonard e Schapira, 2000)

### **1.6. A origem e a patogênese das mutações do mtDNA**

As alterações da seqüência do mtDNA podem ser hereditárias ou somáticas (criadas “*in situ*”). A taxa de mutação do mtDNA é 10 a 20 vezes maior do que a do nDNA, devido a falta da DNA polimerase corretora de erros. A mitocôndria é poliplóide; cada célula humana contém aproximadamente 500 a 2000 mitocôndrias e cada uma contém de 2 a 10 moléculas de mtDNA. Normalmente, todas as moléculas de mtDNA são idênticas no organismo (homoplasmia). Porém, com uma alta taxa de divisões e mutações, podem coexistir, intracelularmente, moléculas normais (tipo selvagens) e moléculas que sofreram mutações (tipo mutante), condição denominada de *heteroplasmia*. Devido a poliploidia mitocondrial, durante a mitose, ocorre uma distribuição aleatória do mtDNA mutado pelas células filhas a cada divisão celular, fenômeno conhecido como segregação mitótica aleatória (figura 5). Por razões ainda não bem compreendidas, a deleção do mtDNA é raramente transmitida por mulheres clinicamente afetadas para a sua prole. Por outro lado, a mulher com mutações de ponto heteroplásmicas ou duplicações do mtDNA podem transmitir em quantidades variáveis o seu DNA mutante para os seus filhos.





**Figura 5-** Representação da segregação mitótica aleatória. (Shoffner e Wallace, 1990)

Em algumas mitocondriopatias, a taxa de mutação em um tecido afetado está diretamente relacionada com o fenótipo clínico, ou seja, quanto mais mtDNA mutado, maior é a gravidade da doença. Contudo, alguns fenótipos graves são independentes da abundância de mtDNA mutado. Fatores outros, como sexo, idade, influência ambiental e a interação com o genoma nuclear, devem contribuir, de alguma forma, para o limiar e a variabilidade da expressão fenotípica (Wallace, 1997; Leonard e Schapira, 2000; Finsterer, 2004). Todos estes fatores são de fundamental importância no momento do aconselhamento genético de famílias portadoras de alterações do mtDNA, pois o cálculo de risco de recorrência será aleatório, podendo variar de 0 a 100%, visto que não há como estimar a quantidade de tecidos afetados com mutações no mtDNA bem como suas conseqüências fenotípicas (Chinnery e Turnbull, 2000).

As mutações no mtDNA são geralmente heteroplasmicas (exceto neuropatia óptica hereditária de Leber) e são causadas por mutações de ponto, deleções e inserções (Schapira e Cock, 1999). As mutações de ponto são freqüentemente herdadas, enquanto as deleções e inserções são usualmente esporádicas. O efeito “gargalo de garrafa” explica o porquê das mutações adquiridas no decorrer da nossa vida não serem transmitidas para as gerações seguintes. Ocorre, provavelmente, uma seleção a favor do mtDNA tipo selvagem no ovócito e uma eliminação natural do ovócito com alta taxa de mutação. Os critérios que definem uma mutação patogênica no mtDNA são: (i) a heteroplasmia, (ii) a quantidade de mtDNA mutado acima do limiar, (iii) relação com algum determinado fenótipo já relatado em indivíduos não relacionados, (iv) ausência desta mutação em indivíduos saudáveis, exceto familiares assintomáticos, (v) em estudos de expressão deve haver uma correlação da mutação com o defeito bioquímico, (vi) a mutação deve alterar um par base ou um aminoácido conservado evolutivamente (Walker e cols., 1996).

### ***1.7. Classificação das doenças mitocondriais***

As doenças mitocondriais podem ser classificadas de acordo com critérios genéticos, bioquímicos ou clínicos. De acordo com os critérios genéticos, a mutação patogênica pode encontrar-se no genoma mitocondrial ou nuclear e suas conseqüências podem ser diretamente sobre a atividade das proteínas que compõe ou não a CRM (Finsterer, 2004) (tabela 3). Será descrito somente as mutações que envolvem o genoma mitocondrial que codificam para proteínas da CRM, tRNA e rRNA.

---

**Tabela 3** Classificação genética das mitocondriopatias

---

1-Doenças causadas por mutações em genes do mtDNA que codificam para proteínas da CRM, tRNA ou rRNA

2-Doenças causadas por mutações no nDNA que codificam para proteínas da CRM

3-Doenças causadas por mutações no nDNA que codificam para proteínas fora da CRM (ataxia de Friedreich, Síndrome de Leigh COX deficiente, Paraparesia espástica hereditária, entre outros)

4-Doenças associadas com defeitos no funcionamento da CRM devido a mutações no genes do nDNA que codificam para proteínas não mitocondriais.

---

Em relação à classificação bioquímica, os defeitos podem estar no transporte inter ou intra-mitocondrial (deficiência da carnitina palmitoil-transferase), defeitos na utilização dos substratos (deficiência da piruvato-desidrogenase), defeitos envolvendo o ciclo de Krebs (deficiência de fumarase), CRM (deficiência do complexo I, II, III, IV ou V).

De acordo com os critérios clínicos, as mitocondriopatias podem ser classificadas como doença de um único órgão ou multissistêmica. Raramente as mitocondriopatias apresentam-se com envolvimento de um único órgão e, quando isso ocorre, com o passar do tempo, torna-se multissistêmica. Em muitas situações, é difícil estabelecer o limite de um grupo de sinais e sintomas associados e a caracterização de uma síndrome mitocondrial clássica. Isto ocorre devido à sobreposição de critérios, tanto sob o aspecto clínico, como laboratorial. Porém, algumas síndromes apresentam características distintas, permitindo seu reconhecimento e classificação. Atualmente, já passam de 40 síndromes descritas, geralmente denominadas pelo seu acrônimo (tabela 4) (Walker e cols., 1996; Zeviani e Di Donato, 2004).

**Tabela 4** Principais síndromes mitocondriais

<b>Doença</b>	<b>Características</b>	<b>Gene/Mutação</b>
Oftalmoplegia externa crônica progressiva. <b>(PEO)</b>	Ptose, fraqueza dos músculos extraoculares e miopatia proximal;  Casos mais graves evoluem para síndrome de Kearns-Sayre;  Início na infância ou adolescência.	Vários/  Deleções múltiplas, deleções simples do mtDNA (esporádicos)  20% Mutações de Ponto T5692G, G5703A (herança materna)
Síndrome de Pearson	Anemia sideroblástica, trombocitopenia, neutropenia, falência hepática, insuficiência hepática.	Vários/  Deleções múltiplas, deleções simples do mtDNA (esporádicos)
Síndrome de Kearns-Sayre. <b>(KSS)</b>	Oftalmoplegia externa crônica e progressiva antes dos 20 anos;  Retinopatia pigmentar;  Distúrbios de condução cardíaca, surdez bilateral, ataxia cerebelar, diabetes, miopatia.	Vários/  Deleções simples e múltiplas e duplicações do mtDNA (esporádico)
Miopatia, encefalopatia, acidose láctica, acidente vascular cerebral. <b>(MELAS)</b>	Acidentes vasculares cerebrais antes dos 40 anos;  encefalomiopatia, convulsões, enxaqueca, demência, acidose láctica, hemiparesia;  Diabete, surdez neurossensorial, retinopatia pigmentar, ataxia cerebelar.	tRNA <sup>LEU(UUR)</sup> /  Mutações de ponto: A3243G, T3271C, A3251G
Epilepsia mioclônica com <i>Ragged Red Fiber</i> <b>(MERRF)</b>	Epilepsia Mioclônica;  Ataxia cerebelar miopatia com ragged red fibers;  Demência, atrofia optica, neuropatia periférica, múltiplas lipomas.	tRNA <sup>lys</sup> /  Mutações de Ponto: A8444G, T8356C
Síndrome de Leigh <b>(SL)</b>	Encefalopatia subaguda necrotizante;  Regressão psicomotora e rápida deterioração neurológica, hipotonia, convulsões, disfunção de tronco cerebral. Aparecimento no primeiro ano de vida.  Alterações em núcleos da base	ATPase6/  Mutações de Ponto: T8993G, T8993C (herança materna)  Genes nucleares

Continuação

<b>Doença</b>	<b>Características</b>	<b>Gene/Mutação</b>
Neuropatia, ataxia e retinite pigmentar ( <b>NARP</b> )	Neuropatia periférica de início na infância ou na vida adulta;  Ataxia, retinopatia pigmentar, alterações em gânglios da base.	ATPase6/  Mutações de Ponto: T8993G, T8993C (herança materna)
Neuropatia óptica hereditária de Leber ( <b>LHON</b> )	Perda visual (central) na segunda ou terceira década de vida, afeta mais homens jovens. Características neurodegenerativas, leva a atrofia óptica	ND1, ND4, ND6/  Mais de 15 mutações de ponto: G11778A (50%); G3460A, T14484C e 14459A (herança materna)
Encefalopatia mio-neuro-gastro-intestinal ( <b>MNGI</b> )	Diarréia crônica, pseudo-obstrução intestinal, oftalmoplegia externa, leucodistrofica, miopatia, acidose láctica. RRF+, COX-.	Vários/  Deleções múltiplas do mtDNA. Defeito de sinalização intergenômica. (herança autossômica recessiva)
Miopatia com cardiomiopatia hipertrófica	Fraqueza muscular, cardiomiopatia.	tRNA <sup>Ile</sup> tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> /  Mutações de Ponto: A4317G, A4269G, A4300G, 3303T, 3260G
Surdez não sindrômica	Surdez neurosensorial ou induzida por antibióticos neurosensorial	12S rRNA/  Mutações de Ponto: A1555G. Deleções e duplicações do mtDNA
Diabete <i>melitus</i> insulino dependente ( <b>NIDDM</b> )	Diabete insulino dependente de herança materna	tRNA <sup>LEU(UUR)</sup> /  Mutação de ponto A3243G

Uma classificação definitiva das doenças mitocondriais requer ainda uma elucidação e uma ampliação do conhecimento sobre todos os genes envolvidos na biogênese do funcionamento das moléculas mitocondriais (Schapira e Cock, 1999).

### **1.8. Apresentação clínica**

**1.8.1- Idade de início:** As doenças mitocondriais podem manifestar os primeiros sinais desde o período embrionário até a vida adulta tardia.

**1.8.2- Características gerais:** Como já relatado nessa revisão, a principal característica destas patologias é a extrema variabilidade de expressão clínica. Contudo, sabemos que os órgãos preferencialmente acometidos na doença mitocondrial são aqueles que dependem de um metabolismo aeróbico intenso, como o cérebro, o músculo esquelético e o coração. Podemos suspeitar de doenças mitocondriais em pacientes que apresentam: 1) uma combinação não explicada de sintomas neuromusculares ou não neuromusculares, 2) curso progressivo, 3) envolvimento simultâneo de órgãos ou tecidos não relacionados. Os sintomas clínicos, tanto isolados como em combinação, podem ocorrer em qualquer estágio, mas com uma característica típica de ir aumentando o número de órgãos envolvidos com a progressão da doença. O envolvimento progressivo de órgãos ocorre independentemente da idade de início da apresentação clínica. Contudo, os sintomas iniciais podem tanto persistir e gradualmente piorar, quanto melhorar ou até mesmo desaparecer, enquanto outros órgãos passam a ser acometidos (Munnich e Rustin, 2001). A tabela 5 descreve os principais órgãos acometidos e as características clínicas e laboratoriais das doenças mitocondriais

**Tabela 5** Principais características das doenças mitocondriais

<b>Órgão/ Sistema</b>	<b>Sinal/Sintoma</b>
Sistema nervoso central	Encefalopatia, hipotonia de tronco, convulsões, mioclonias, regressão neurológica, ataxia cerebelar, enxaqueca, leucodistrofia, atrofia cerebral difusa, depressão, demência, apnéias recorrentes, letargia, episódios semelhantes a um AVC, alterações em TC e/ou RNM com/sem espectroscopia.
Sistema nervoso periférico	Miopatia, neuropatia sensório-motora
Músculo	Fraqueza, dor muscular, intolerância aos exercícios, mioglobinúria, cãibras.
Coração	Cardiomiopatia hipertrófica, dilatada, bloqueio cardíaco completo, bloqueio da condução ventricular, síndrome de pré-excitação.
Gastrointestinal	Diarréia crônica, vômitos recorrentes, anorexia, pseudo-obstrução intestinal, constipação, disfunção hepatocelular, falência hepática.
Medula óssea	Anemia, neutropenia, trombocitopenia, síndrome mielodisplásica.
Endocrinológico	Baixa estatura, deficiência de GH, diabetes mellito insulino dependente ou não insulino dependente, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, hipopituitarismo, falência gonadal.
Renal	Tubulopatia proximal, síndrome nefrótica, síndrome de Fanconi, falência renal.
Olhos	Ptose palpebral, oftalmoplegia externa progressiva, limitação da movimentação ocular, catarata, atrofia óptica, degeneração pigmentar da retina.
Ouvido	Surdez neurosensorial, ototoxicidade por aminoglicosídeo.
Craniofacial	Microcefalia, face arredondada, fronte ampla, pescoço curto.

AVC: acidente vascular cerebral, TC: tomografia de crânio, RNM: Ressonância nuclear magnética, GH: hormônio de crescimento.

É importante ressaltar que a manifestação clínica de adultos difere de pacientes pediátricos. Pacientes adultos, usualmente, apresentam sinais de miopatia associados a uma grande variabilidade de envolvimento de SNC como ataxia, surdez neurosensorial, polineuropatia e retinopatia pigmentar.

Alguns se queixam de fadiga muscular e intolerância ao exercício. Os fenótipos clássicos são observados mais em adultos. Pacientes pediátricos apresentam um quadro multissistêmico, mas geralmente com atraso no desenvolvimento psicomotor, hipotonia generalizada, acidose láctica e cardiomiopatia (Zeviani e Di Donato, 2004).

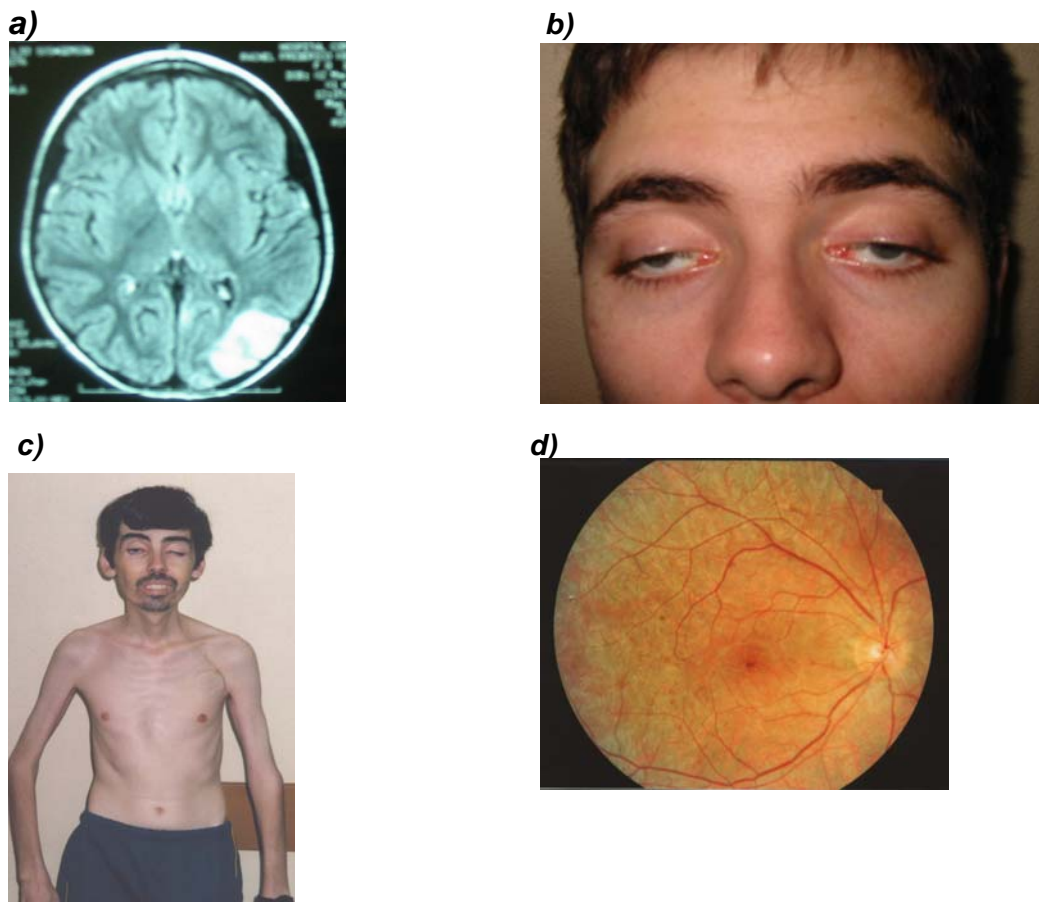
**1.8.3- Alguns fenótipos e síndromes específicas:** As síndromes descritas a seguir, de forma mais detalhada, são as principais estudadas nesse trabalho:

- **Encefalomielopatia necrotizante subaguda (Síndrome de Leigh de herança materna):** A síndrome de Leigh é uma patologia degenerativa, multissistêmica, de aparecimento, geralmente, no primeiro ano de vida. As suas principais características são a regressão psicomotora com rápida deterioração neurológica, hipotonia, convulsões, atrofia óptica, retinopatia pigmentar (em 40% dos casos), distúrbios ventilatórios, leucodistrofia, lesões simétricas em tronco cerebral, tálamo e região posterior da medula. A mutação do mtDNA mais freqüente é a T8993G do gene da ATPase 6. Um outra mutação que envolve a troca de uma timina por uma citosina na posição 8993 do gene ATPase 6 também foi descrita em algumas famílias. As manifestações da síndrome de Leigh com características clínicas e anatomo-patológicas, porém de herança autossômica recessiva, também está associada à deficiência isolada do complexo II ou IV e da enzima piruvato-desidrogenase. Muitos desses casos já foram descritos com a mutação no gene nuclear SURF1 em pacientes com Leigh deficientes em COX (Shoffner e cols., 1992; Silvestri e cols., 1992; Tiranti e cols., 1995).
- **Epilepsia mioclônica com fibras rotas vermelhas (MERRF):** Os pacientes com síndrome de MERRF apresentam-se com um quadro de encefalopatia associada à epilepsia mioclônica, ataxia, miopatia com fibras rotas vermelhas ou *ragged red fibres* (RRF), atrofia óptica, neuropatia, demência, calcificações em núcleos da base. Os primeiros sintomas surgem na infância, mas também está descrito o seu



aparecimento na vida adulta. Aproximadamente 80 a 90% dos indivíduos com MERRF apresentam a mutação de ponto heteroplásmica na região 8344 no T<sub>ψ</sub>C “loop” do gene de tRNA<sup>lys</sup> (Wallace e cols., 1988). Porém, em algumas famílias, pode-se encontrar a transição heteroplásmica T para C na posição 8356, envolvendo o mesmo gene (Wallace e cols., 1988; Silvestri e cols., 1992; Zeviani e Antozzi, 1992). A mutação A8344G pode ser também encontrada associada a fenótipos clínicos diferentes (Folgero e cols., 1995).

- **Miopatia, encefalopatia, acidose láctica, acidente vascular cerebral (MELAS):** Esta síndrome é, provavelmente, a encefalomiopatia mitocondrial mais freqüente e caracteriza-se por enxaqueca intermitente, vômito recorrente, fraqueza proximal, acidente vascular cerebral (AVC) sem correlação com região vascular e envolvendo região occipital, encefalomiopatia, convulsões, demência, acidose láctica, presença ocasional de RRF e áreas de hipodensidade na tomografia computadorizada (TC). A apresentação clínica usualmente ocorre durante a infância ou adolescência. A surdez e o *diabete mellitus* não insulino dependente pode desenvolver-se mais tarde. Os episódios de AVC afetam a região parieto-occipital e, posteriormente, o córtex. O diagnóstico diferencial com outros tipos de AVC é o início antes dos 40 anos e a não correlação da área isquêmica com território vascularizado, já que essa isquemia é devido a alterações metabólicas em certas regiões cerebrais. No estudo histoquímico, algumas fibras musculares demonstram a hiperatividade da COX e, no bioquímico, o déficit dos complexos I, III, IV. Em 80% dos casos, detecta-se a mutação de ponto heteroplásmica A para G na alça de di-hidrouridina na posição 3243 do gene tRNA<sup>LEU(UUR)</sup> (Vilarinho e cols., 1999). Em 7,5% dos casos é possível identificar a mutação de ponto heteroplásmica T para C na região 3271 do mesmo gene (Goto e cols., 1990, 1991). Nos casos restantes, a mutação pode ser nuclear ou localizada em outra região do mtDNA. Alguns pacientes com mutações características de MELAS podem apresentar sinais clínicos de MERRF e vice-versa (Goto, 1993, 1995; Hammans e cols., 1995; Leonard e Schapira, 2000) (figura 6a).



**Figura 6-** Fenótipo clínico dos pacientes com doença mitocondrial

**(a)** Ressonância nuclear magnética de crânio de uma paciente com 7 anos e mutação A3243G: lesão isointensa em T1 no lobo occipital direito representando um recente isquemia; **(b)** paciente ptose palpebral com oftalmoplegia crônica; **(c)** paciente com síndrome de KSS; **(d)** retinopatia pigmentar em um paciente com síndrome KSS

- **Neuropatia, ataxia e retinite pigmentar (NARP):** A NARP, caracteriza-se por atraso de desenvolvimento, demência, degeneração pigmentar da retina, neuropatia sensório-motora, convulsões e ataxia. A nível molecular, verifica-se que a NARP está associada a duas mutações de ponto diferentes que afetam o mesmo nucleotídeo (8993), no gene mitocondrial que codifica para a subunidade 6 do complexo V (ATPase 6). A mutação mais comum corresponde à substituição de uma base T por G, e a outra à substituição da T por C. Quando a proporção da mutação T8993G/C é superior a 90%, o fenótipo clínico deixa de ser

NARP e passa a ser o de uma encefalopatia fatal: a síndrome de Leigh de transmissão materna, descrita anteriormente (De Vivo, 1993; Zeviani e cols., 1996).

- **Oftalmoplegia externa progressiva (PEO):** Esta miopatia mitocondrial com ou sem retinite pigmentar ou fraqueza muscular é descrita como a manifestação clínica mais comum relacionada aos defeitos da CRM. A idade de início é na segunda ou na terceira década de vida, tendo, geralmente, um curso clínico benigno. Os indivíduos manifestam oftalmoplegia (paralisia da musculatura ocular extrínseca), ptose palpebral com ou sem miopatia mitocondrial. O diagnóstico diferencial inclui a miastenia *gravis*, algumas miopatias congênitas, e a distrofia óculo-faríngea. Os casos mais graves, de início antes dos 20 anos de idade e associados a retinopatia pigmentar, defeitos de condução cardíaca, ataxia e proteinorraquia elevada são caracterizados como sendo síndrome de Kearns-Sayre. Em 47% dos casos de PEO, ocorrem deleções múltiplas ou simples do mtDNA (esporádicos). Em 50% dos casos, mutações de ponto no mtDNA (A3243G, T5692G, G5703A) causam PEO, o restante, é devido a mutações de ponto no nDNA (Goto e cols., 1990; Leonard e Schapira, 2000) (figura 6b).
- **Síndrome de Kearns Sayre (KSS):** Esta síndrome caracteriza-se por ser um subtipo grave da PEO. A principal tríade é a manifestação antes dos 20 anos com oftalmoplegia externa progressiva e retinopatia pigmentar, seguida de um dos critérios a seguir: bloqueio de condução cardíaca, ataxia cerebelar e/ou proteinorraquia acima de 100 mg/dl. Alguns casos podem manifestar diabetes melito, surdez neurosensorial, atrofia óptica, diarreia crônica ou pseudo-obstrução intestinal. Ao nível molecular, encontramos, em 80% dos casos, a deleção ou duplicações simples e/ou múltiplas do mtDNA observadas somente em tecido muscular. Em 4% dos casos, ocorrem mutações de ponto (Wallace, 2001; De Sanctis e cols., 2003; Park e cols., 2004) (figura 6c e 6d).

### **1.9. Diagnóstico**

O diagnóstico das doenças mitocondriais, devido sua heterogeneidade genética e a ausência de um marcador padrão de doença, é um desafio (Finsterer, 2004). Vários protocolos tem sido propostos, porém nenhum deles atinge uma taxa aceitável de diagnóstico (Bernier e cols., 2002; Wolf e Smeitink, 2002). A abordagem de um paciente com suspeita de doença mitocondrial deve ser individualizada e requer uma investigação multidisciplinar que envolve, além da avaliação clínica, estudos de imagem e função, estudo histopatológico, bioquímico e molecular. A tabela 6 divide os exames que devem ser realizados na primeira avaliação, e nas avaliações subseqüentes (segundo e terceiro momento). A investigação deve ser passos-a-passo para não submeter o paciente a exames invasivos e de custo elevado sem uma correta indicação. O músculo é o tecido ideal para investigação molecular, morfológica e bioquímica dos efeitos patogênicos das mutações no mtDNA, devido ao fato de que estas células necessitam um grande aporte energético e apresentam um baixo índice de renovação (Smeitink e cols., 2001).

Outros exames como tomografia de crânio (TC), ressonância nuclear magnética (RNM) cerebral associada ou não à espectroscopia por emissão de prótons, eletroencefalograma (EEG), eletrocardiograma (ECG), ecocardiograma e eletroneuromiografia são muito importantes para rastrear o envolvimento mutissistêmico e direcionar a hipótese diagnóstica (Zeviani e cols., 1996).

A definição do diagnóstico de uma patologia mitocondrial irá depender além dos achados clínicos e moleculares, dos achados relacionados à biópsia muscular. Os exames de triagem são somente utilizados no sentido de indicar com mais precisão uma investigação mais específica e invasiva. Devido à dificuldade no diagnóstico, e o fato de muitos pacientes apresentarem um curso lentamente progressivo da doença, recomenda-se que esses pacientes devem ser re-avaliados periodicamente, e preferencialmente, pelo mesmo médico.

**Tabela 6** Investigação diagnóstica em pacientes com suspeita de doença mitocondrial

	P	S	T
<b>Sangue</b>			
Glicose, teste de tolerância à glicose	X		
CPK, TGO, TGP, LDH, aldolase, amônia, lactato basal, corpos cetônicos	X		
Provas de função da tireóide e paratireóide	X		
Hemograma, plaquetas	X		
Lactato pré e pós prandial, piruvato		X	
Aminoácidos		X	
Gasometria	X		
Ácidos graxos, acilcarnitinas, carnitina livre e total		X	
Análise de DNA		X	
<b>Urina</b>			
Aminoácidos, ácidos orgânicos, cetonas, lactato		X	
<b>Líquor</b>			
Lactato, piruvato, glicose, proteínas, ácidos orgânicos		X	
<b>Neurofisiologia</b>			
ENMG, EEG, PEV, PEA	X	X	
<b>Investigação cardíaca</b>			
ECG, ecocardiograma, Raio-X de tórax	X	X	
<b>Avaliação oftalmológica</b>			
Acuidade visual, fundoscopia, retinograma	X	X	
<b>Neuroimagem</b>			
TC/RNM de crânio		X	
Ressonância magnética com próton espectroscopia (determinação de lactato <i>in vivo</i> )			X
<b>Biópsia de músculo e outros tecidos (nervo, fígado, fibroblastos)</b>			
Histoquímica, imuno-histoquímica, microscopia eletrônica, atividade enzimática por espectrofotometria, extração de DNA			X

P: investigação laboratorial inicial, S: investigação secundária, T: investigação terciária, CPK: creatino fosfoquinase, TGO: aspartato aminotransferase, TGP: alanina aminotransferase, LDH: lactato desidrogenase, ENMG: eletroneuromiografia, EEG: eletroencefalograma, PEV: potencial evocado visual, PEA: potencial evocado auditivo, ECG: eletrocardiograma, TC: tomografia de crânio, RNM: ressonância nuclear magnética.

**1.9.1- Triagem bioquímica:** A triagem para os defeitos genéticos da fosforilação oxidativa deve incluir a determinação de lactato, piruvato e corpos cetônicos no sangue. A determinação do lactato deve ser feita em jejum e 1 hora após o período prandial, além de repetidas dosagens durante o dia. Se a acidemia láctica oscilar entre 2 a 3 mmol/L, a determinação do lactato no líquido deve ser efetuada (no caso de apresentação neurológica) assim como a razão lactato/piruvato (L/P) após o teste de sobrecarga de glicose e/ou teste de esforço. Estes testes são desnecessários quando o

lactato basal já for maior que 7 mmol/L. É importante e relativamente simples, a determinação do estado de oxi-redução no plasma. A alteração neste estado é consequência da deficiência funcional do ciclo de Krebs, devido ao excesso de NADH e à falta de NAD, com elevação secundária do lactato sérico, corpos cetônicos e da relação L/P nos doentes. Um aumento da relação NADH/NAD<sup>+</sup> é um indicativo de diminuição da formação de ATP e, conseqüente da formação de superóxidos, o que leva ao prejuízo de uma série de outras rotas metabólicas, como a da  $\beta$ -oxidação. Isto é particularmente notado nos períodos pós-absortivos, quando mais NAD é necessário para adequado metabolismo dos substratos glicolíticos. Da mesma maneira, em consequência da deficiência do ciclo de Krebs e ao direcionamento da acetil-CoA para a cetogênese, a síntese de corpos cetônicos tende a aumentar após as refeições em pacientes com doenças mitocondriais (hipercetonemia paradoxal). Portanto, a observação de uma acidemia láctica persistente (>2,5 mmol/L), com relação L/P elevada (>20) e presença de corpos cetônicos, é altamente sugestiva de doença mitocondrial, principalmente nos períodos pós absortivos e em crianças (Munnich e cols., 1996). Com a realização da cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG/MS) é possível determinar a excreção de ácido láctico, intermediários do ciclo de Krebs e metabólitos altamente sugestivos de doença da CRM, como, por exemplo, o ácido 3-metilglutacônico.

**1.9.2- Atividade bioquímica das enzimas da CRM:** A análise dos 5 complexos enzimáticos da CRM é realizada por espectrofotometria e os resultados são expressos, não apenas em valores absolutos, mas, também, em taxas relacionadas à atividade isolada de um complexo ou dos diversos complexos da CRM. Nessas condições, pacientes com valores absolutos no limite inferior da normalidade podem ser diagnosticados como enzimaticamente deficientes. Para cada ensaio enzimático é necessário uma quantidade mínima de tecido (até 20 mg), que pode ser retirada por biópsia (céu aberto ou agulha) do fígado, rim, fibroblasto, miocárdio ou músculo esquelético. O ensaio pode ser realizado com o músculo fresco ou a amostra deve ser imediatamente congelada e armazenada em nitrogênio

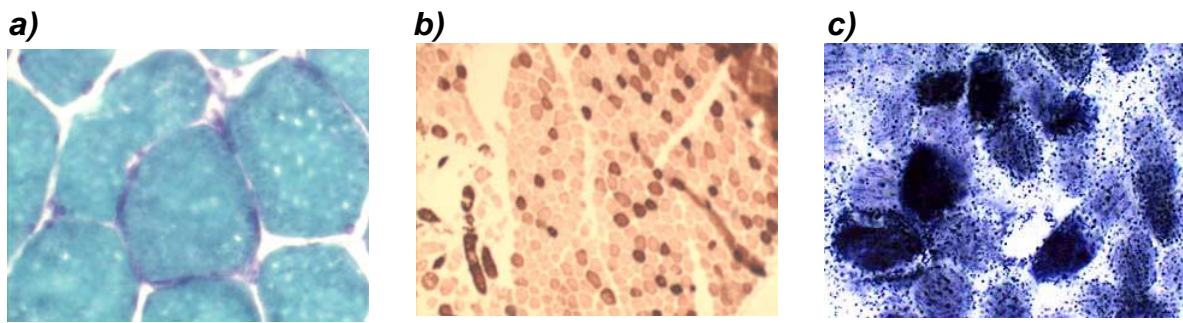
líquido ou a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A avaliação da atividade enzimática é considerada um teste de diagnóstico, e até pouco tempo era considerada uma peça fundamental na investigação dessas patologias. Contudo, trabalhos recentes têm demonstrado que há uma série de problemas em relação aos diversos protocolos *in vivo* ou *in vitro* utilizados pelos diferentes laboratórios. Alguns centros realizam testes fisiológicos para definir a capacidade oxidativa dos pacientes em combinação com a atividade dos 5 complexos da CRM. A dosagem das enzimas não segue um protocolo padrão entre os diferentes laboratórios, sendo que alguns utilizam músculo congelado, outros, músculo fresco. O substrato utilizado para avaliar a oxi-redução também varia de um local para outro, o que torna impossível definir um verdadeiro valor de “normalidade”. Conseqüentemente, a interpretação dos resultados desses estudos não deve ser isolada e, preferencialmente, deve ser realizada em um centro de alta complexidade que oferece um programa completo de diagnóstico de doenças mitocondriais (Bernier e cols., 2002; Taylor e cols., 2004). Além disso, alguns aspectos importantes são considerados quando se estudam as enzimas da CRM (Sparaco e cols., 1993; Munnich e Rustin, 2001):

- i. Uma atividade normal não exclui disfunção mitocondrial, mesmo nos tecidos onde se expressa a doença. Isto pode ser explicado pela heteroplasmia, mosaicismo celular e heterogeneidade tecidual. A repetição do ensaio pode ser necessária em alguns casos.
- ii. O armazenamento incorreto das amostras pode levar a resultados falso-positivos, visto que os complexos I, II e III (atividade dependente de quinona) são altamente sensíveis a modificações de temperatura.
- iii. Discrepâncias dos resultados em relação aos valores de controle indicam falhas nas condições do experimento; portanto, simultaneamente à dosagem enzimática dos complexos é importante determinar a atividade da enzima citrato-sintase, localizada na matriz mitocondrial e utilizada como controle do estado de conservação da amostra.

**1.9.3- Estudo histoquímico:** A histologia da biópsia muscular é, normalmente, de grande valor para o diagnóstico, apesar de, ocasionalmente, pacientes com miopatia mitocondrial, devido à mutação no mtDNA e alguns casos de LHON, apresentarem histologia normal. A análise histológica típica revela a presença RRF, obtidas através de cortes de criostato, corados pelo tricrômio de Gomori modificado, ficando com aparência avermelhada pelo acúmulo anormal de mitocôndrias abaixo da membrana sarcolemal, destacando-se nitidamente da coloração esverdeada do sarcoplasma (Figura 7a). A presença de RRF não ocorre em todos os casos, mas, quando aparece, na exclusão de miopatias inflamatórias e distrofia miotônica, é um indicador diagnóstico de patologia mitocondrial. As colorações de histoquímica indicam a atividade de algumas proteínas do complexo da CRM. Este estudo é realizado a partir do preparo do músculo com cortes de criostato, podendo demonstrar a hiperatividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDH, complexo II). Essas fibras são, geralmente, negativas para a atividade da citocromo c oxidase (COX) (complexo IV) nos pacientes com PEO, KSS ou MERRF, mas positivas nos casos de MELAS. Nos pacientes com síndrome de Leigh de herança materna, ou outras manifestações na infância, não se observa presença de RRF, sendo a atividade da COX, na maioria dos casos, negativa. O achado de SDH hiperintenso associado a fibras COX negativo, é uma indicação precisa de que o paciente é portador de um mutação no mtDNA que afeta síntese de proteína (deleção no mtDNA, tRNA ou rRNA) (Dimauro e cols., 2004).

É importante ressaltar que fibras COX negativas e RRF positivas podem estar presentes após os 40 anos, mas isso não deve exceder a 5% das fibras observadas. A atividade da ATPase demonstra a integridade miofibrilar, predominância de tipo de fibra muscular e a sua distribuição (Tulinius e cols., 1991; Romero e cols., 1996; Leonard e Schapira, 2000) (Figura 7b e 7c). A análise ultraestrutural, por microscopia eletrônica, demonstra inclusões paracristalinas em alguns pacientes. Além disso, pode ser observada alteração morfológica da mitocôndria, sugestivas de patologias da CRM.



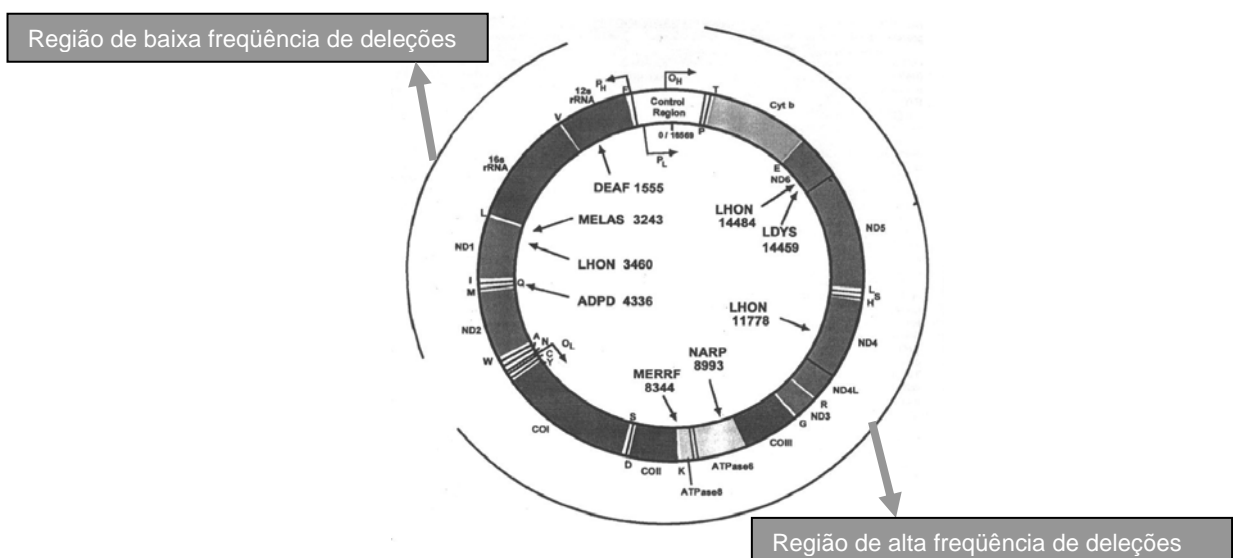


**Figura 7-** Fenótipo muscular das doenças mitocondriais  
**(a)** Presença de RRF com a coloração do tricromio de gomori modificado,  
**(b)** presença de fibras COX – negativa, **(c)** hiperatividade SDH em algumas fibras.

**1.9.4- Análise molecular:** A análise molecular pode ser realizada no nDNA ou no mtDNA. A análise no mtDNA consiste em detectar, basicamente, de dois tipos de alterações: (i) rearranjos de grande escala (deleções e duplicações) e (ii) mutações de ponto (Dimauro e cols., 2004):

- i. Deleções e duplicações: As deleções podem ser simples ou múltiplas e a sua detecção é usualmente realizada através da hibridização com sonda específica (*Southern-blot*), a qual fornece informação sobre presença ou ausência de rearranjos e a proporção de mtDNA mutado, no caso de uma mutação heteroplásmica (Moraes e cols., 1992). A quantificação relativa de mtDNA deletado pode ser também obtida através por uma metodologia mais recente denominada PCR em tempo real (Walker e cols., 1996; Schinogl e cols., 2001; He e cols., 2002). Os leucócitos e plaquetas que contêm deleções do mtDNA tendem a ser eliminados da circulação. Portanto, a análise em amostras de sangue não é informativa (com exceção na síndrome de Pearson). Devido à sua habilidade de reter uma certa quantidade de mtDNA com deleção, o músculo esquelético é o tecido ideal para a análise. As mutações espontâneas do mtDNA não se encontram nos progenitores nem na descendência do caso índice e, apesar de existirem mais de 100 tipos diferentes de deleções descritas, estas, na maioria das vezes, não envolvem as regiões de origem de replicação ( $O_H$  e  $O_L$ ). Acima de 90% das deleções ocorrem no arco maior entre  $O_H$  e  $O_L$ , o que engloba dois terços do genoma e contém

os genes citocromo b, ND6, ND5, ND4, ND3, COX III, ATPase 6 e 8, COX II, e COX I, além dos tRNAs que intercalam estes genes (Wallace, 1999) (figura 8). Cerca de um terço dos pacientes exibem o mesmo tipo de alteração, por isso denominada “deleção comum”, uma região com provável instabilidade, pois se encontra entre duas repetições de 13 pb de adeninas. Esta deleção corresponde à remoção de 4977 pb do mtDNA, entre o gene da ATPase 8 e a da ND5 (Holt e cols., 1988; Shoffner, 1999). As duplicações parciais são raramente encontradas e, na literatura, foram descritos poucos casos com essa alteração (Houshmand e cols., 2004). Os principais fenótipos associados a esse tipo de mutação são: a KSS esporádica, a PEO e a síndrome de Pearson. Duplicações do mtDNA foram também encontradas associadas a manifestações cerebrais, renais e insuficiência endócrina.

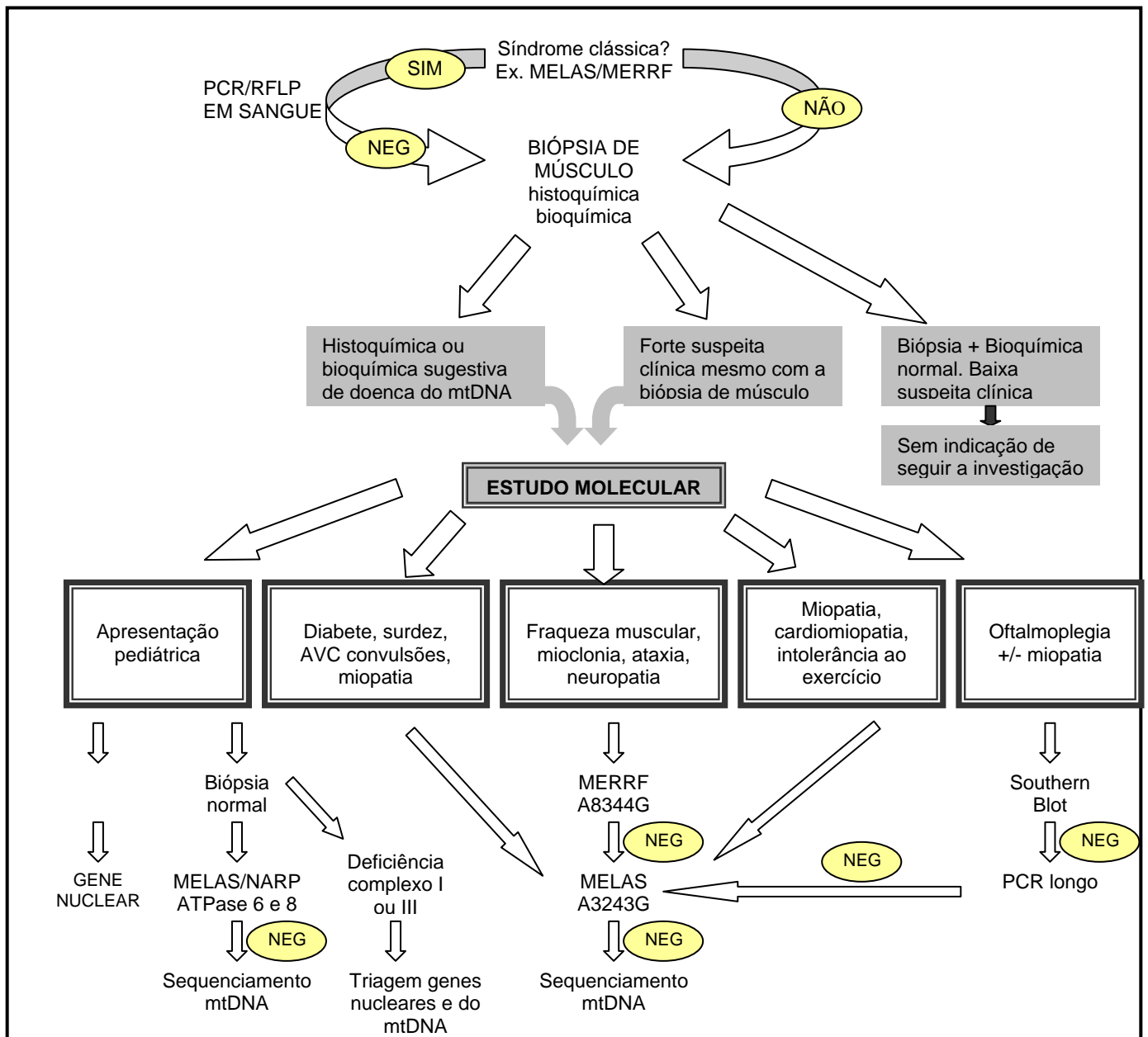


**Figura 8** Genoma mitocondrial com a localização de algumas mutações patogênicas (adaptado de Wallace, 1999).

- ii. Mutações de ponto: As mutações detectáveis através da análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) de regiões do mtDNA que tenham sido previamente amplificadas por

PCR. Devido à alta taxa de mutações do mtDNA e à presença de mutações em uma única família ou polimorfismos populacionais específicos, é essencial distinguir mutações não deletérias das mutações patogênicas. Na maioria das vezes, as mutações a serem pesquisadas em cada doente são determinadas pela história clínica e pela hipótese diagnóstica. A pesquisa de mutações novas pode ser efetuada através da técnica *single-stranded conformational polymorphism analysis* (SSCP) e/ou de seqüenciamento do mtDNA. Até o momento, mais de 100 mutações de ponto foram identificadas, sendo que 4 delas consideradas mais freqüentes, 3243 A-G “MELAS/PEO”, 8344 A-G “MERRF”, 8993 T-G “NARP/Leigh” e 11778 A-G “LHON” (Goto, 2001; Wong e cols., 2002; Dimauro e cols., 2004) (figura 8).

A investigação genética deve ser realizada em todos os pacientes com síndromes clássicas ou presença de sinais e sintomas característicos de doença mitocondrial. Contudo, após a primeira análise, um resultado positivo confirma a natureza mitocondrial da doença, enquanto que uma análise negativa não exclui a possibilidade de uma mutação ocorrer em outro sítio do mtDNA ou mesmo em genes nucleares. Recentes trabalhos, demonstram que a investigação molecular é falha em identificar mutações em aproximadamente 50% dos pacientes adultos e 90% dos pediátricos com doenças mitocondriais, e que somente 5% das mutações estão no mtDNA (McFarland e cols., 2002; Zeviani e Di Donato, 2004). A figura 9 mostra um protocolo de investigação molecular proposto por Taylor e cols (2004).



**Figura 9** - Fluxograma de avaliação de paciente com suspeita de doença mitocondrial (adaptado de Taylor e cols, 2004)

### 1.10. Aconselhamento genético

O geneticista clínico enfrenta uma grande dificuldade na realização do aconselhamento genético das doenças mitocondriais. Isso ocorre devido à heterogeneidade da doença, à desconhecida taxa de heteroplasmia de cada indivíduo, bem como o seu limiar de expressão. Sabe-se que o risco de ter um filho afetado aumenta conforme a taxa de mtDNA mutado na mãe, porém

não há um “grau” de heteroplasmia que indique um risco tão baixo ao ponto de ser ignorado. Mulheres com deleção simples do mtDNA, como KSS e PEO, apresentam um risco inferior a 8% na transmissão da doença. Aparentemente, a maioria dos pacientes com mutações no mtDNA é constituída de casos esporádicos. Nos casos em que ocorre uma mutação de ponto (MELAS, MERRF, etc) podemos identificar alguns indivíduos na linhagem materna com alguma sintomatologia sugestiva de doença mitocondrial. Por exemplo, sabe-se que em 40% dos pacientes com a mutação mais freqüente do LHON (G11778A), não há história familiar de doença ocular. Contudo, é importante ficar alerta à presença dos mais variados sintomas pela linhagem materna, pois esse pode representar a possibilidade de um indivíduo ter uma mutação, ainda que sejam pouco afetados clinicamente (Leonard e Schapira, 2000). Alguns pontos devem ser lembrados no momento do aconselhamento genético das doenças mitocondriais (Warner e Schapira, 1997; Chinnery e cols., 1998):

- Tanto genes nucleares como mitocondriais podem estar envolvidos com a causa da doença. Portanto, a herança pode ser mendeliana ou materna.
- Pode haver expressão leve da doença dentro da família, incluindo a surdez neurosensorial, enxaquecas, cefaléias e demência ou epilepsia sem causa aparente.
- A mutação mitocondrial pode passar para toda a prole de uma mulher afetada, porém é impossível prever o nível de gravidade da doença nos filhos. Alguns podem ter manifestações precoces e graves e outras manifestações tardias e leves.

### **1.11. Diagnóstico pré-natal**

Assim como o diagnóstico do indivíduo afetado enfrenta uma série de dificuldades técnicas inerente às características do mtDNA e da função que a mitocôndria desempenha no funcionamento do nosso organismo, o diagnóstico pré-natal também é muito difícil, visto que a análise molecular obtida de amniócitos ou vilosidades coriônicas não necessariamente reflete o que ocorre nos demais tecidos fetais. Além disso, devido à segregação mitótica aleatória, a percentagem de mutação em uma amostra pré-natal

pode se alterar ainda durante a vida uterina ou pós-natal. Portanto, não há opções de diagnóstico pré-natal, mesmo considerando as freqüentes mutações de ponto em tRNA para MELAS ou MERRF (Chinnery e cols., 1998; DiMauro, 2001).

### **1.12. Tratamento**

Após o diagnóstico, o manejo das doenças mitocondriais pode ser dividido em 4 momentos distintos. No primeiro, com base em alguns estudos retrospectivos e relatos de casos, algumas informações podem ser passadas para os pacientes no sentido de prevenir complicações e informar corretamente a chance de transmissão da doença aos seus descendentes. No segundo, a monitorização clínica é fundamental para evitar complicações, como, por exemplo, o uso precoce do marcapasso para impedir o bloqueio cardíaco completo que ocorre na KSS. No terceiro, uma intervenção pode ser apropriada em alguns estágios da doença (correção da ptose palpebral, cirurgia para catarata, uso de gastrostomia), bem como o suporte social e psicológico. Finalmente, o uso de alguns co-fatores vitamínicos em doses padronizadas pode trazer algum benefício, levando em consideração a quase ausência de efeitos colaterais. As vitaminas normalmente indicadas, e com dosagens padronizadas, são a vitamina C e K, tiamina (B1), riboflavina (B2) e ubiquinona (coenzima Q10) (Chinnery e Turnbull, 1999; Chinnery, 2004; DiMauro e cols., 2004) (tabela 7).

**Tabela 7** Vitaminas e Cofatores utilizados no tratamento das mitocondriopatias (Finsterer, 2004)

<b>Medicação</b>	<b>Dose recomendada</b>
Coenzima Q10	5-15 mg/kg/dia
L-carnitina	30-100 mg/kg/dia
Vitamina C	100-1500 mg/dia
Vitamina D	200-1200 IU/dia
Vitamina K3	5-30 mg/dia
Tiamina	50-100 mg/dia
Riboflavina (B2)	50-200 mg/dia
Ácido lipóico	180-300 mg/dia
Selênio	25-50 µg/dia
Creatina mono hidratada	5 g/dia
Indebenona	90-225 mg/dia

\* Finsterer, 2004

Nos pacientes com crises convulsivas, o uso de fenobarbital e ácido valpróico deve ser evitado, pois esses anticonvulsivantes podem inibir ainda mais a atividade da OXPHOS (Taylor e cols., 1997; Leonard e Schapira, 2000). Ensaios clínicos recentes com o uso do dicloroacetato mostraram que esta droga é eficaz na redução da acidose láctica e na melhora de alguns sintomas clínicos, como por exemplo, a cefaléia. Contudo, devido a variabilidade dos sintomas, e ainda, o desconhecimento da história natural das doenças mitocôndrias, parece que a melhora é temporária e sem efeito na sobrevivência dos pacientes (Stacpoole e cols., 2003; Barshop e cols., 2004).

O que se sabe, até o momento, é que todas as tentativas terapêuticas empregadas no sentido de reverter ou estabilizar a progressão da doença mitocondrial foram anedóticas e a conclusão é de que ainda não há um tratamento eficaz e curativo para estas patologias.

### **1.13. *Freqüência***

Em um estudo com 204 pacientes realizado no “Istituto Nazionale Neurologico C. Besta”, em Milão, a freqüência de distúrbios mitocondriais na população da Itália em relação ao conjunto de patologias neurometabólicas (incluindo doenças lisossômicas de depósito, doenças dos peroxissomos, acidúrias orgânicas, entre outras) foi de 25% (Zeviani e cols., 1996). Este e outros relatos informais demonstram o que já era um consenso entre os clínicos, de que as desordens mitocondriais não são patologias raras e algumas mutações (como a A3243G) são relativamente comuns na população. Com os avanços e a descoberta de novas mutações, pode-se chegar à conclusão de que mitocondriopatia é o erro inato do metabolismo mais freqüente, com um estimativa de 1 caso para cada 5.000 nascidos vivos (Thorburn, 2004, 2004). Contudo, e em função da dificuldade no diagnóstico e na classificação dessas patologias, ainda há uma sobreposição nas freqüências obtidas para as doenças envolvendo somente o mtDNA ou atividade da CRM (envolve mtDNA e nDNA). Um estudo no norte da Inglaterra, a prevalência mínima foi de 6,9/100.000 (95% CI 5,3-7,8) para mutações de ponto no mtDNA em adultos e 13,1/100.000 para crianças e adultos (Chinnery e cols., 2000; Chinnery e cols., 2002). Em um estudo mais recente, a incidência de doença mitocondrial foi estimada como sendo de 1 caso em cada 5.000 a 10,000 nascidos vivos (McFarland e cols., 2002).

### **1.14. *Freqüência em nosso meio***

No nosso meio, não existem trabalhos realizados com objetivo de estimar a incidência das patologias mitocôndrias. Isso ocorre, pois existem poucos laboratórios que investigam estas doenças no Brasil e geralmente o fazem com grandes limitações técnicas. O principal fator limitante está na formação de uma equipe de investigação multidisciplinar coordenada, o que é fundamental para o estudo bem sucedido destas patologias.



### **1.15. Justificativas para este estudo**

- As mitocondriopatias têm prevalência desconhecida no Brasil, mas devem estar presentes na nossa população na mesma proporção em que estão em outras regiões do mundo, onde representam uma porção significativa dos casos de encefalomiopatia associado à doença multissistêmica de neonatos, crianças e adultos, os quais estão sendo sub-diagnosticados pela carência dos recursos necessários para um diagnóstico definitivo.
- A investigação das doenças mitocondriais tem um impacto importante na compreensão da patogênese das crianças e adultos afetados por doenças neurodegenerativas.
- A criação de um protocolo para o estudo clínico, bioquímico, histoquímico e genético-molecular de pacientes com suspeita de doença mitocondrial irá permitir uma racionalização da investigação, evitando em muitos casos a realização de exames desnecessários e de alto custo. Além disso, o protocolo irá encurtar o tempo até a obtenção de um diagnóstico definitivo, permitindo ainda o manejo mais adequado do paciente e o correto aconselhamento genético.
- São mundialmente escassas as iniciativas para a investigação de patologias mitocondriais, não existindo um protocolo estabelecido para isso em nosso meio; adicionalmente, a necessidade de um estudo molecular e bioquímico diretamente em tecido muscular torna praticamente bastante difícil a utilização de laboratórios de referência no exterior.
- Finalmente, um grupo complexo de doenças como o das patologias mitocondriais, com repercussão multissistêmica, torna indispensável a proposta de uma abordagem multidisciplinar, tanto para o diagnóstico quanto para o manejo dos casos, integrando os aspectos clínicos, bioquímicos, morfológicos e genotípicos de cada caso.

### **1.16. Objetivos**

- 1) Desenvolver e aplicar um protocolo de investigação clínica e laboratorial em um grupo de pacientes com alto risco de apresentar uma doença mitocondrial;
- 2) Comparar os achados clínicos e laboratoriais em pacientes com e sem mutação identificada no mtDNA, estabelecendo os critérios clínicos e laboratoriais que conferem maior risco para a presença de uma doença mitocondrial;
- 3) Empregar a variável “alta probabilidade” e “baixa probabilidade” em pacientes com suspeita clínica de doença mitocondrial, correlacionando-a com os resultados do protocolo molecular;
- 4) Testar um protocolo de análise histoquímica de tecido muscular em todos os casos de suspeita de doença mitocondrial submetidos à biópsia de músculo;
- 5) Desenvolver um protocolo não radioativo para detectar deleções no mtDNA em pacientes com suspeita de doença mitocondrial;
- 6) Detectar e quantificar as deleções no mtDNA na amostra estudada através da técnica de PCR em tempo real, correlacionando com o fenótipo clínico;
- 7) Descrever os achados de ressonância nuclear magnética com espectroscopia por emissão de prótons em pacientes com deleção no mtDNA e fenótipo clínico atípico.

## **Capítulo II**

### **DIAGNOSIS OF MITOCHONDRIAL DISORDERS: APPLICATION OF A DNA-BASED PROTOCOL IN SELECTED PATIENTS**

---

---

**DIAGNOSIS OF MITOCHONDRIAL DISORDERS:  
APPLICATION OF A DNA-BASED PROTOCOL IN SELECTED PATIENTS**

Carolina Fischinger Moura de Souza<sup>1,2</sup>, Leticia Saldanha Laybauer<sup>1</sup>, Neiva Copetti<sup>3</sup>, Bianca Machado da Cruz<sup>1</sup>, Marcele Cerski<sup>3</sup>,  
Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>1,4</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>

(Submetido ao Journal of Medical Genetics)

<sup>1</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Internal Medicine Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup> Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Address Correspondence to:

Dr. Carolina Fischinger Moura de Souza

Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55-51-2101-8011; Fax: +55-51-2101-8010

e-mail: [cfsouza@hcpa.ufrgs.br](mailto:cfsouza@hcpa.ufrgs.br)

---

**Abstract**

**Objective:** Given the difficulty to establish a standardised routine for patients with clinical suspicion of mitochondrial disorder, the objective of the present study was to propose a protocol combining clinical and laboratory data in order to point out the best type of molecular investigation for patients with clinical suspicion of mtDNA disorder and to evaluate which clinical factors are predictive of mtDNA mutation and can be used as signs for physicians to be able to decide when costly and invasive diagnostic procedures should be performed.

**Methods:** We analysed 5 point mutations in leukocytes mtDNA, studied the rearrangements in muscle mtDNA, and performed the sequencing of tRNA<sup>leu</sup> and tRNA<sup>lys</sup> of 43 patients with clinical suspicion of mitochondrial disorder. Patients with positive and negative results for mtDNA mutation were then compared as to their clinical and laboratory features.

**Results:** Seventeen patients (39.9%) showed mutations in mtDNA distributed as follows: 4 patients with MELAS (A3243G), 1 patient with Leigh syndrome (T8993C), and 12 patients with deletions in mtDNA. Comparing the groups of patients, the features most significantly found in the group of patients with mtDNA mutation were: myopathy ( $p=0.032$ ), pigmentary retinopathy ( $p=0.007$ ), ophthalmoplegia and ptosis ( $p=0.002$ ), short stature ( $p=0.04$ ), hypotrophy ( $p=0.033$ ), and lactic acidosis ( $p=0.006$ ).

**Conclusion:** The accurate clinical and laboratory selection used was appropriate and the protocol applied was efficient, since we confirmed the diagnosis in 17 of the 43 patients with clinical suspicion of disorders associated to a defect in mtDNA.

**Key words:** mtDNA mutation, mitochondrial disorders, mtDNA deletions, MELAS, Leigh syndrome.

**Introduction:**

Mitochondrial disorders are among the most common inborn errors of metabolism, and perhaps the most challenging disorder to diagnose and manage. [1] [2] The accurate diagnosis of patients with mitochondrial disease is very important, but has many potential difficulties. [3] First, the well-defined entities can be genetically heterogeneous, and some genetic cause may be associated to different clinical syndromes. Conversely, different clinical syndromes can be caused by the same mutation. Second, there is no diagnostic criteria for adults, infants or children patients. [4] [5] [6] Third, mitochondrial DNA (mtDNA) harbours more than 200 pathogenic mutations (<http://www.mitomap.org>). In addition, the interrelation between mtDNA and nuclear genes in relation to the function of mtDNA is still unclear. [7] However, it is now clear that mtDNA disorders are not only neuromuscular diseases, but theoretically can also give rise to any symptom, in any organ or tissue, at any age, always requiring an integrated approach from clinicians of many different areas. [8] [9] [10] Clinical manifestations of mtDNA diseases are different in adult and infant patients. Normally, adult patients show signs of myopathy associated with variable involvement of the CNS (ataxia, hearing loss, seizures, and movement disorders). [7] Several morphological and biochemical hallmarks characterize many, albeit not all, of these cases. The best known morphological finding is perhaps the transformation of scattered muscle fibres into “ragged red fibres” (RRF), characterised by the accumulation of abnormal mitochondria under the sarcolemmal membrane. In paediatric patients, the most frequent clinical features are severe psychomotor delay, generalised hypotonia, lactic acidosis, and signs of cardiorespiratory failure. [11]

We classify pathogenic mtDNA mutations into two groups: (a) point mutations, usually detected in leukocyte mtDNA and characterised by some common classical neurological syndromes, originally recognised as Mitochondrial Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS; A3243G), Myoclonus Epilepsy and Ragged Red Fibres (MERRF; A8344G), Leigh syndrome/neuropathy ataxia retinitis pigmentosa (LS/NARP; T8993C/G), and (b) large-scale rearrangements (deletions and duplications), usually detected in muscle mtDNA only and characterised as being Kearns Sayre syndrome (KSS), Sporadic Progressive External Ophthalmoplegia (PEO) or Pearson syndrome.

Patients with pathogenic mtDNA defects usually harbour a mixture of mutant and wild type molecules within each cell, a phenomenon called heteroplasmy. In general, the ratio of mutated mtDNA determines phenotypic expression. [12] If mitochondrial diseases are multisystemic disorders, affect almost any system, and their onset is at any age, how do we decide which patients to investigate? What diagnostic protocols and criteria should we use? How do we find the underlying molecular defect?

Recent studies have proposed different approaches and flowcharts to perform the diagnosis of mitochondrial disorders, considering clinical and laboratory features. [3] [4] [5] Therefore, the objectives of this study were: (a) to establish a protocol combining clinical and laboratory data to indicate the best molecular investigation to be conducted in a group of patients with suspicion of mtDNA disorder, and (b) evaluate which clinical features and laboratory data predictive of mtDNA mutation are indicative for physicians to decide when to perform a costly and invasive procedure.

---

## **Patients and methods**

### *Patients*

From 2000 to 2004, physicians of various specialties referred for evaluation 78 patients with clinical suspicion of mitochondrial disorder to the ambulatory of mitochondrial disorders of the Medical Genetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Of these, 17 were excluded due to confirmation of diagnosis of another disorder (Krabbe disease, organic acidemia, lipofuscinose ceróide, ischemic hypoxemic cerebral palsy), and 18 did not complete the protocol. Thus, the sample was composed of 43 patients, with median age of 14 years (0-53) at evaluation and median age of 7 years (0-37) at appearance of first symptoms. Table 1 shows the characteristics of the patients who underwent the whole protocol.

The present study was approved by the Research and Ethical Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by the National Committee of Ethics on Research (CONEP). All patients included in this study signed an informed consent form before the beginning of evaluations.

### *Methods*

All 43 patients underwent the study protocol, which included the collection of information about family history, pregnancy, delivery, perinatal history, age at onset, first symptoms at onset, age at death, and involved organ systems. In the laboratory investigation, some exams were performed in blood (glucose, lactate, renal and hepatic evaluation, amino acid chromatography, mitochondrial DNA analysis), and others in urine (organic acid analysis by gas chromatography/mass spectrometry). To complement, image and function exams were performed (neurological cerebral tomography and/or magnetic resonance imaging with/without H<sup>+</sup> spectroscopy, electromyogram, electroencephalogram, electrocardiography and echocardiography). Retinal eye exams were performed by an ophthalmologist. Baseline lactate was measured at least twice in different days, and its mean value was calculated. Fasting and 1-hour post-prandial lactate assays were also performed.

In order to evaluate the importance of clinical evaluation a variable denominated “high likelihood” and “low likelihood” was defined. We classified our patients in



two groups according to the criteria found in table 2. From our 43 patients, 23 (53.5%) were classified as having “high likelihood” of mtDNA disease, and 20 (46.5%) were classified as having “low likelihood”.

#### *Mitochondrial DNA analysis*

Mitochondrial DNA was extracted from leukocytes and/or skeletal muscle according to standard methods. [13] Detection of specific point mutations A3243G, T3271C, A8344G, T8356C and T8993G/C, was performed through restriction fragment length polymorphism (RFLP), following polymerase chain reaction (PCR) amplification of mtDNA regions of interest. Primers used in this study have already been described. [14] [15] [16]

Large-scale mtDNA deletions and rearrangements were evaluated by Southern blot performed in mtDNA isolated from skeletal muscle. The ECL™ 3'-oligolabelling and detection system (Amersham) was used for probe labelling and detection of mtDNA.

Sequencing analysis of tRNA<sup>Lys</sup> and tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> was performed on an ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) using the Big Dye Terminator Cycle Kit. This sequencing analysis was only carried out in cases where no mutation was detected by the procedures described above.

#### *Muscle histochemistry*

Muscle biopsy was performed in patients who were negative for the screened mutation in leukocyte or that agreed with the invasive procedure, or both. An open muscle biopsy from biceps was performed, and collected samples were immediately frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Fresh-frozen blocks were sectioned at a thickness of 10 µm, processed with hematoxylin/eosin and modified Gomori-trichrome to characterize the morphology of the muscle fibre and to identify the RRF. Presence of RRF was defined as being when muscle showed more than 3% of fibres affected. Histochemical stain was performed for succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (COX). All lamina were examined by a medical pathologist under a light microscope.

#### *Statistical methods*

In order to test the correlation among categorical variables, we applied the association Chi-square test ( $\chi^2$ ) with application of continuity Yates' correction, for 2x2 contingency tables with residual analyses when necessary. The Fisher test was applied when the expected value was lower than 5, or sample size was smaller than 25. The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare means for independent samples, since continuous variables analysed here did not have a normal distribution. Odds ratios were calculated with confidence intervals (CI) for clinical features which reached statistical significance with the  $\chi^2$  Yates' test. Statistical significance was assumed for “*p*” values less than 0.05.

## Results

### *Molecular study*

The complete molecular investigation protocol of mitochondrial DNA was performed in 43 patients (fig 1). Mutation on mtDNA were found in 17 of the 43 patients (39.5%), distributed as follows: 4 patients carried A3243G mutation, 1 patient carried T8993C mutation, and 12 patients carried deletions (11 single and one multiple deletions) (fig 2). No abnormalities were found in mtDNA of 26 patients (60.5%), even following sequencing of tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> and tRNA<sup>Lys</sup> from leukocyte blood or muscle mtDNA.

After screening for 5 point mutations of mtDNA, diagnosis was reached in 5 patients (11.6%). In addition, the analysis of muscle mtDNA rearrangements, performed in 23 patients, allowed for the diagnosis of 12 patients (27.9%). In this sample no patient were found to carry T3271C, A8344G or T8356C mutation.

### *Clinical phenotypes*

All 4 patients with point mutation A3243G for MELAS syndrome (1 woman and 3 men) presented classical clinical pictures. The main finding in this group was the rapid neurological deterioration, and its first manifestation was a stroke-like episode associated to important lactic acidosis. Age at onset of first symptoms ranged from 7 to 30 years, and time for definition of diagnosis, from the early symptoms, was 1 to 15 years. Two patients of this group died. One from pseudo gastrointestinal obstruction at age 19 and the other from complications due to neurological deterioration at age 58, whose family investigation showed that the mother and one brother carried the same mutation. However, these positive cases were not included in the sample of the present work.

The mutation for Leigh syndrome was found in one girl aged 1 year and 2 months who presented developmental delay since the age of 4 months, ophthalmoplegia since the age of 11 months, progressive deterioration, and neuroimaging findings compatible with involvement of mesencephalus (fig 3); This patient died at 18 month of age. Mutation carried by this patient was not found in her mother.

As to the 12 patients with large scale rearrangements of mtDNA, only 5 presented the classic syndrome with ptosis, progressive external

ophthalmoplegia, pigmentary retinopathy and proximal myopathy suggestive of CPEO (1 patient), and KSS (4 patients). Age at onset of symptoms of these patients ranged from 7 to 12 years; investigation of these patients had initially been due to low stature. Four patients presented a set of multisystemic signs and symptoms highly suggestive of mitochondriopathies, but not compatible with the classic syndrome. Finally, the 3 other patients presented a picture of degenerative encephalopathy associated with muscular alterations less suggestive of mitochondriopathies. The onset of these patients' symptoms was from ages 4 to 12 years, and these patients were initially classified as "low likelihood". Two of these patients died at ages 19 and 23, from clinical complications of their neurodegenerative picture.

#### *Survey on clinical features and laboratory findings*

Clinical signs and laboratory results from our sample population are listed in table 3, divided according to results of mtDNA analysis. The means age at onset of symptoms, age at beginning of clinical evaluation, and age at confirmation of diagnosis were lower in the group of patients without mtDNA mutation, and showed a statistically significant difference. Mean values of plasmatic pre-prandial and post-prandial lactate and the difference between pre and post-prandial values were not statistically significant. No statistically significant difference was found in gender between groups.

The presence or absence of mtDNA mutation showed a statistically significant difference between groups of high and low likelihood ( $p < 0.001$ ). This means that the good early hypothesis favours the diagnosis of mtDNA mutations with a 8.8 higher chance of reaching the diagnosis (95%CI=1.99-38.95).

The most common features in the group with mtDNA mutation were lactic acidosis, hypotrophism, progressive external ophthalmoplegia, and abnormal cerebral CT or MRI. In the patients without mtDNA mutations, abnormal EEG and seizures, followed by developmental delay, were the most common features. However, features seen significantly more often in the group with mtDNA mutations were myopathy ( $p=0.032$ ), pigmentary retinopathy ( $p=0.007$ ), ophthalmoplegia and ptosis ( $p=0.002$ ), short stature ( $p=0.04$ ), hypotrophy ( $p=0.033$ ), and lactic acidosis ( $p=0.006$ ).

---

### *Odds risk ratios*

Individuals with ENMG compatible with myopathy were 6.9 times more likely to have mtDNA mutations (95%CI=1.39-32.36). The risk to have mtDNA mutation for other clinical features was 17.5 times higher for pigmentary retinopathy (95%CI=1.9-161.1), 10.0 times higher for ophthalmoplegia and ptosis (95%CI=2.4-42), 4.7 times higher for short stature (95%CI=1.2-17.9), 5.2 times higher for hypotrophy (95%CI=1.3-20.4), and 8.8 times higher for lactic acidosis (95%CI=1.9-38.9).

### *Enzyme histochemistry*

Muscle biopsy was performed in 14 of 17 patients with an identified mutation and 11 of 26 patients with no mutation detected. The complete histochemistry protocol for mtDNA mutations was performed in 14 positive patients. The presence of RRF was the most frequent finding both in patients with deletion and in patients with mtDNA point mutation (table 4).

## Discussion

The aim of our study was to identify mtDNA mutations in a group of patients with clinical suspicion of mitochondrial disorder using a clinical-laboratory protocol. Our series showed that the proposed protocol allowed the molecular diagnosis in 39.5%. We highlight the importance of performing muscle biopsy for the study of mtDNA rearrangements, which enabled the diagnosis of 27.9% of suspected cases; this data is in accordance with previously published data. [3] [17] We believe that the frequency found for mtDNA deletions is because patients with Kearns Sayre and PEO have distinctive phenotypes and, perhaps, reflect a more careful clinical selection. However, only 5 of the 12 patients with mtDNA deletion presented a picture typical of KSS or PEO. The other patients presented multisystemic manifestations with or without neuromuscular alterations. This fact stresses the increasing need for physicians to suspect of mitochondrial disorder in patients with non-neuromuscular multisystemic manifestations, as previously described by other authors. [18] Even being invasive, costly and risky, physicians should encourage muscular biopsy, in order to increase the chance to reach the diagnosis.

In the literature, we found few studies that used a systematic laboratory protocol and that evaluated simultaneously children and adults. [19] [20] [21] Using a broader molecular protocol, Jaksch *et al* [21] obtained a frequency of 29% for pathogenic mtDNA mutations and deletions. In these patients, the frequency of mutations in adults was 48% and in children, 18%. In a study with paediatric patients, Skladal *et al* reported a detection frequency of 67% grouping mtDNA point mutations and deletions. [8] In that study, 75 children underwent a clinical, biochemical and histochemical screening previous to the molecular investigation.

Studies that did not count with a careful clinical or biochemical selection presented a low frequency of molecular diagnosis. [22] [23] [24] [25] Marotta *et al* used a molecular protocol similar this study in 1725 non-selected patients and obtained an overall frequency of mtDNA point mutations/rearrangements detection of 7.9%. Despite being a heterogeneous sample, the frequency of mtDNA rearrangements was higher than that of point mutations; the highest frequency found was for mutation A3243G.

---

Although we are aware that molecular investigation fails to identify the genetic defect in 50% of adult patients and in 80-90% of children [7] with mitochondrial disorder, we think that a careful clinical selection made by an experienced physician contributes to a greater amount of success in molecular diagnosis. As many authors propose, the isolated use of analysis of most frequent point mutations and the study of the mtDNA rearrangement in muscular tissue in selected patients results in an acceptable rate of diagnosis of mtDNA disorders. [3] [12]

The finding of only one patient with point mutation T8993C NARP is due to the high mean age of patients tested, since in general the clinical manifestation of Leigh syndrome occurs in the neonatal period and leads to death by the age of 2. Besides, adults with NARP mutation may be asymptomatic. [22]

In our study, sequencing of mutational hot spots tRNA<sup>leu(UUR)</sup> and tRNA<sup>lys</sup> did not increase the number of patients diagnosed.

The second purpose of our study was to identify the clinical features predictive of mtDNA mutation for the 43 individuals studied. Clinical features in this group of patients that were significantly associated with mtDNA abnormality were myopathy, pigmentary retinopathy, ophthalmoplegia and ptosis, short stature, hypotrophy, and lactic acidosis. Our findings are consistent with data from studies carried out by other groups, except for short stature, hypotrophy, and lactic acidosis. [24] [26] [27] In mitochondrial disorders, the electrophysiological findings may be normal, myopathic, neurophatic or a combination of myopathic and neurophatic features. [27] We consider that hypotrophism secondary to mild or severe myopathy is an important clinical sign of mtDNA mutation.

Seizures, mental retardation and alterations in EEG were found more frequently in the group that we did not find a mutation. The mean age of this group was lower suggesting that these symptoms are more frequent in patients that do not carry mtDNA mutation. This findings is in agreement with other authors. [7] [11] [28]

The preset study, values of lactate measured did not differ from values of pre and post-prandial lactates. This may be explained because the group of patients without mutation had more children and usually lactic acidemia is a strong marker of mitochondrial disorder. [19] Moreover, the measure of serum lactate may suffer biologic and pre-analytical interference, and physicians must

---

always value slightly increased results when in face of patients with multisystemic disorders. It is important to keep in mind that many patients with severe mitochondrial defects have normal blood lactate levels. [10] The study conducted by *Lamont et al* compared findings of patients with and without mtDNA mutation to their serum lactic acid values and found more patients with lactic acidemia in the group with mtDNA mutation. [24]

The variable high likelihood was significantly important in the finding of mtDNA mutations, in which 14 of the 17 cases were positive for mtDNA point mutation/rearrangements. Possibly the 9 patients that presented high likelihood and absence of mtDNA alterations present a rare mutation. An alternative explanation is that these patients have another disorder, genetic or not, with multisystemic involvement, as cited in other papers. [29] These results reinforce the indication of complete mtDNA sequencing when the most frequent point mutations are not found in the cases with strong clinical suspicion (high likelihood) of mtDNA diseases.

In this study we did not perform measurement of enzymes of the respiratory chain differently from others. [8] [20] [21] [26] Some studies show that there is great difficulty in obtaining standardized results of these measurements due to technical difficulties. [3] Distinguishing between normal and abnormal values of respiratory chain enzyme activities remains a contentious issue, and the varied approaches used by different centres may make impractical to develop a consensus on specific cut-offs to delineate major and minor criteria. [4]

As to histochemical findings, this article confirms that the most sensitive “detector” of mtDNA diseases is the presence of RRF, which were positive in 91.6% of patients with deletions and in one patient with the A3243G point mutation. On the other hand, we know that this finding is not always present in patients with mitochondriopathy. Fifty percent of patients with mtDNA deletion and 100% of patients with point mutation present COX-negative fibres, confirming that mutations affect the synthesis of mitochondrial proteins of the respiratory chain in most patients.

In conclusion, the results obtained in this study prove that the molecular protocol used in patients with a careful clinical evaluation contributes to a greater success in the diagnoses of mtDNA disorders. We also know that sequencing of all mitochondrial genome may increase the number of successful



diagnoses, but this would not be cost-effective in the screening of mtDNA diseases.

Our data suggest that provided a systemic approach is taken, the majority of patients with mtDNA disorders may be diagnosed by selected investigation. Nevertheless, muscle biopsy should be considered because analysis of this material allowed a higher number of diagnoses. Considering the high estimated frequency of mitochondrial disorders, among inborn errors of metabolism is increasingly important the interaction between clinical evaluation and DNA-based protocols.

**Acknowledgments and affiliations:**

We thank the patients and families who collaborated with this study. We thank Jorge Alberto Lopes for his assistance with histochemistry and Dr. Rossana Mizunski Peres for her assistance with statistical analysis. This work was supported by grants from Brazilian Funding Agencies (PRONEX-MCT, CNPq, FIPE/HCPA, PROPESQ/UFRGS). We also thank CAPES/ICCTI for supporting training activities.

---

**References:**

1. Thorburn DR. Mitochondrial diseases: not so rare after all. *Intern Med J* 2004;**34**(1-2):3-5.
2. Chinnery PF, Turnbull DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001;**106**(1):94-101.
3. Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull DM. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul Disord* 2004;**14**(4):237-45.
4. 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**(9):1406-11.
5. Wolf NI, Smeitink JA. Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology* 2002;**59**(9):1402-5.
6. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 2001;**106**(1):18-26.
7. Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain* 2004;**127**(Pt 10):2153-72.
8. Skladal D, Sudmeier C, Konstantopoulou V, Stockler-Ipsiroglu S, Plecko-Startinig B, Bernert G, Zeman J, Sperl W. The clinical spectrum of mitochondrial disease in 75 pediatric patients. *Clin Pediatr (Phila)* 2003;**42**(8):703-10.
9. Zeviani M, Bertagnolio B, Uziel G. Neurological presentations of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis* 1996;**19**(4):504-20.

- 
10. Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial medicine. *Qjm* 1997;**90**(11):657-67.
  11. Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 2003;**16**(5):585-94.
  12. Chinnery PF, Howell N, Andrews RM, Turnbull DM. Clinical mitochondrial genetics. *J Med Genet* 1999;**36**(6):425-36.
  13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**(3):1215.
  14. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;**290**(5806):457-65.
  15. Moraes CT, Ricci E, Petruzzella V, Shanske S, DiMauro S, Schon EA, Bonilla E. Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nat Genet* 1992;**1**(5):359-67.
  16. 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**(3):238-40.
  17. McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM. The neurology of mitochondrial DNA disease. *Lancet Neurol* 2002;**1**(6):343-51.
  18. Wong LJ. Recognition of mitochondrial DNA deletion syndrome with non-neuromuscular multisystemic manifestation. *Genet Med* 2001;**3**(6):399-404.

- 
19. Jackson MJ, Schaefer JA, Johnson MA, Morris AA, Turnbull DM, Bindoff LA. Presentation and clinical investigation of mitochondrial respiratory chain disease. A study of 51 patients. *Brain* 1995;**118 (Pt 2)**:339-57.
  20. Nissenkorn A, Zeharia A, Lev D, Fatal-Valevski A, Barash V, Gutman A, Harel S, Lerman-Sagie T. Multiple presentation of mitochondrial disorders. *Arch Dis Child* 1999;**81(3)**:209-14.
  21. Jaksch M, Kleinle S, Scharfe C, Klopstock T, Pongratz D, Muller-Hocker J, Gerbitz KD, Liechti-Gallati S, Lochmuller H, Horvath R. Frequency of mitochondrial transfer RNA mutations and deletions in 225 patients presenting with respiratory chain deficiencies. *J Med Genet* 2001;**38(10)**:665-73.
  22. 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. *Intern Med J* 2004;**34(1-2)**:10-9.
  23. Kwon SJ, Park SS, Kim JM, Ahn TB, Kim SH, Kim J, Lee SH, Ha CK, Ahn MY, Jeon BS. Investigation of common mitochondrial point mutations in Korea. *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1011**:339-44.
  24. Lamont PJ, Surtees R, Woodward CE, Leonard JV, Wood NW, Harding AE. Clinical and laboratory findings in referrals for mitochondrial DNA analysis. *Arch Dis Child* 1998;**79(1)**:22-7.
  25. Liang MH, Wong LJ. Yield of mtDNA mutation analysis in 2,000 patients. *Am J Med Genet* 1998;**77(5)**:395-400.
  26. Arpa J, Cruz-Martinez A, Campos Y, Gutierrez-Molina M, Garcia-Rio F, Perez-Conde C, Martin MA, Rubio JC, Del Hoyo P, Arpa-Fernandez A, Arenas J. Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients. *Muscle Nerve* 2003;**28(6)**:690-5.

27. Nardin RA, Johns DR. Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 2001;**24**(2):170-91.
28. Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial DNA and disease. *Lancet* 1999;**354** Suppl 1:S117-21.
29. Pulkes T, Liolitsa D, Nelson IP, Hanna MG. Classical mitochondrial phenotypes without mtDNA mutations: the possible role of nuclear genes. *Neurology* 2003;**61**(8):1144-7.

*Table 1 Characteristics of 43 patients with clinical suspicion of mitochondrial disorder*

<b>Characteristics</b>	<b>N (%)</b>
Neurological manifestation	
seizures	24 (55.8)
abnormal CT/MRI	22 (51.2)
ataxia	14 (35.5)
deafness	13 (30.2)
stroke	11 (25.6)
myopathy	10 (23.2)
Extraneurological manifestation	
lactic acidosis	23 (53.5)
short stature	16 (37.2)
cardiologic	13 (30.2)
endocrinopathy	10 (23.2)
renal tubular dysfunction	9 (21.0)
Gender	
Male	25 (58.1)
Female	18 (41.9)
Familial recurrence	6 (14.0)
Patients who died during the study	7 (16.3)

MRI: Magnetic resonance imaging

---

Table 2 Clinical diagnostic hypothesis criteria\*

---

**High likelihood**

*Combination of multisystemic symptoms that is essentially pathognomonic for mtDNA mutations. Symptoms must include at least three of the organ system presentations described elsewhere [10] namely neurologic, muscular, cardiac, endocrine, gastrointestinal, renal, hematological, otologic, ophthalmologic or pancreas and liver;*

*or*

*Presentation with a classical syndrome like MELAS, MERRF, Kearns Sayre, CPEO or maternal inheritance of Leigh syndrome.*

**Low likelihood**

*Nonspecific encephalomyopathy in children: seizures, lactic acidosis and/or hypotonia*

*Patients with “idiopathic” progressive neurological deterioration  
Isolated symptoms like stroke in young patients, or hypertrophic cardiomyopathie or neurological or endocrinological manifestation.*

---

\* modified from *Bernier et al, 2002.*



Table 3 Clinical features and laboratory findings according to mtDNA analysis

	positive mtDNA mutation % (N)	negative mtDNA mutation % (N)	p value
Gender			NS
Male	64.7 (11)	53.8 (14)	
Female	35.3 (6)	46.2 (12)	
Mean age at onset of symptoms	29.5*	17.1*	< 0.001
Mean age at evaluation	28.8*	17.5*	0.004
Mean fasting (pre-prandial) lactate	18.4*	13.5*	NS
Mean lactate post-prandial	17.9*	13.0*	NS
Difference of fasting and post-prandial lactate	20.1*	16.4*	NS
High Likelihood	82.4 (14)	34.6 (9)	0.006
<b>Clinical Signs and Symptoms:</b>			
Death	23.5 (4)	11.5 (3)	NS
Abnormal analysis of organic acid	17.6 (3)	20.8 (5 of 24)	NS
Abnormal EEG	52.9 (9)	65.4 (17)	NS
Abnormal auditory potential	50.0 (7 of 14)	24.0 (6 of 25)	NS
Abnormal visual potential	50.0 (7 of 14)	20.0 (5 of 25)	NS
Abnormal EMG (myopathy)	46.7 (7)	11.5 (3)	0.032
Abnormal cerebral CT or MRI	64.7 (11)	42.3 (11)	NS
Hepatocellular failure	5.9 (1)	3.8 (1)	NS
Renal tubular dysfunction	29.4 (5)	15.4 (4)	NS
Stroke-like episodes	29.4 (5)	23.1 (6)	NS
Diabetes mellitus	35.3 (6)	15.4 (4)	NS
Heart block	29.4 (5)	7.7 (2)	NS
Sensorineural deafness	35.3 (6)	15.4 (4)	NS
Ataxia	47.1 (8)	23.1 (6)	NS
Cardiomyopathy	17.6 (3)	11.5 (3)	NS
Pigmentary retinopathy	41.2 (7)	3.8 (1)	0.007
Optic atrophy	6.3 (1 of 16)	11.5 (3)	NS
Ophthalmoplegia and ptosis	70.6 (12)	19.2 (5)	0.002
Short stature	59.0 (10)	23.1 (6)	0.04
Developmental delay	35.3 (6)	53.8 (14)	NS
Seizures	41.0 (7)	65.4 (17)	NS
Hypotrophy	76.5 (13)	38.5 (10)	0.033
Lactic acidosis	82.4 (14)	34.6 (9)	0.006
Maternal inheritance	5.9 (1)	19.2 (5)	NS

NS: not significant

EEG: electroencephalogram; EMG: electromyography; CT: computed tomography; MRI: magnetic resonance imaging

\* Mean Rank

*Table 4 Histopathological analysis*

<b>Histochemistry</b>	<b>Patients with A3243G tRNA<sup>leu(UUR)</sup> mutation % (N)</b>	<b>Patients with simple or multiple deletions of mtDNA % (N)</b>
Evidence of muscular atrophy	100 (0)	83.4 (10)
Positive for RRF	50 (1)	91.6 (11)
Scattered SDH-intense	50 (1)	41.6 (5)
COX negative fibres	100 (2)	50 (6)

RRF: ragged red fibres on Gomori trichrome stain; SDH: succinate dehydrogenase

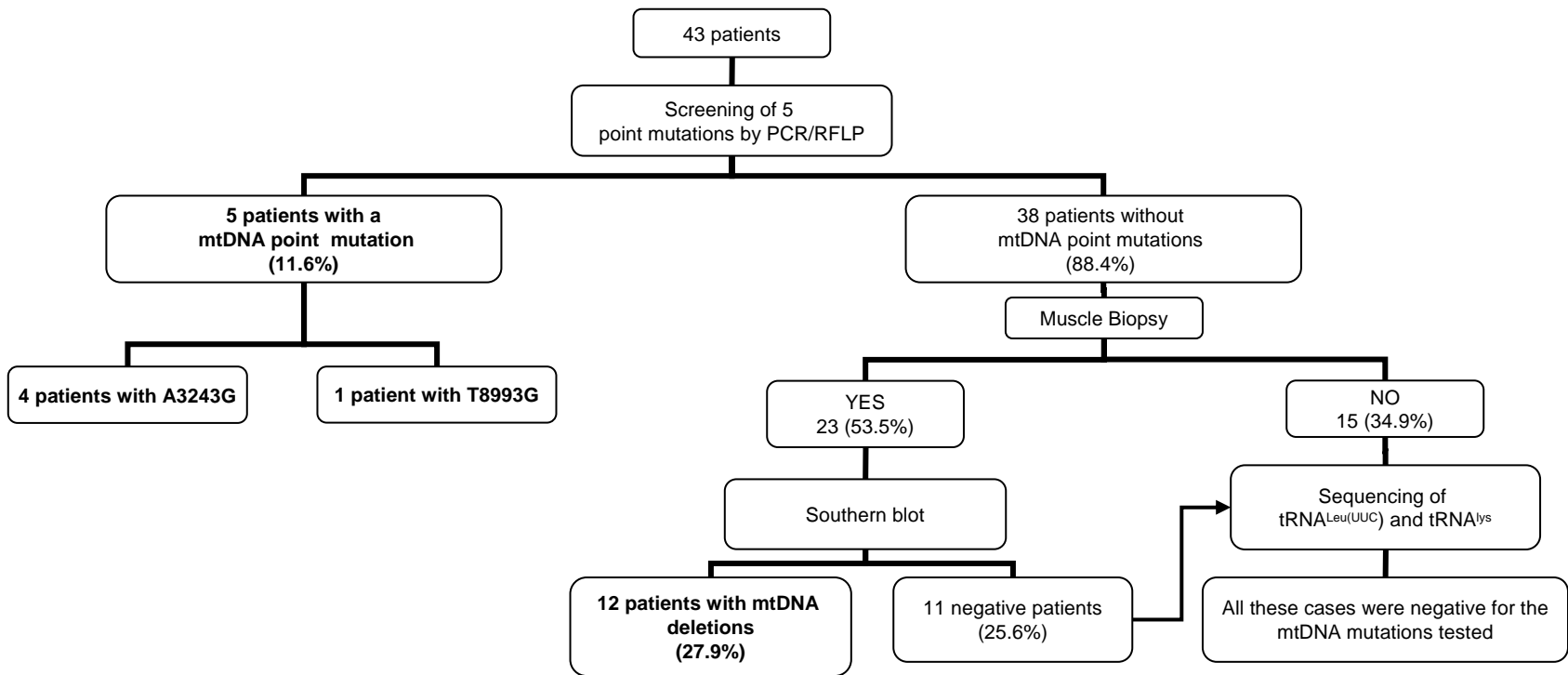
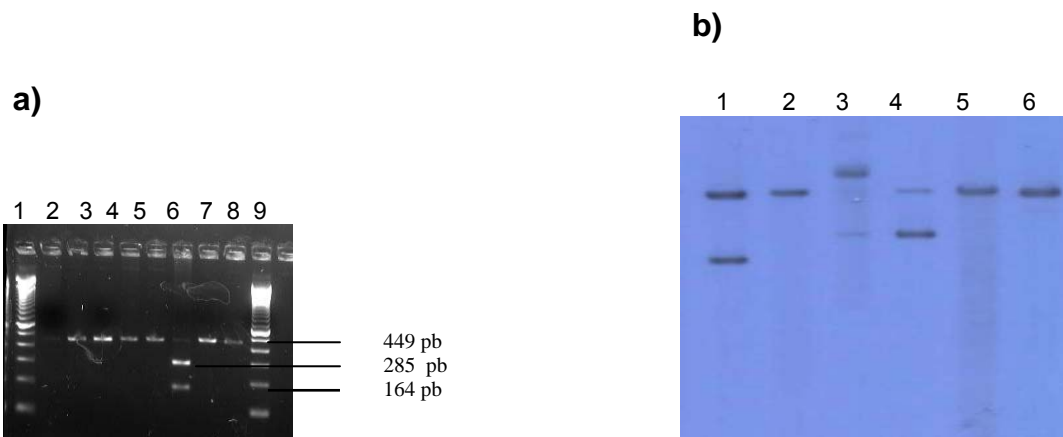
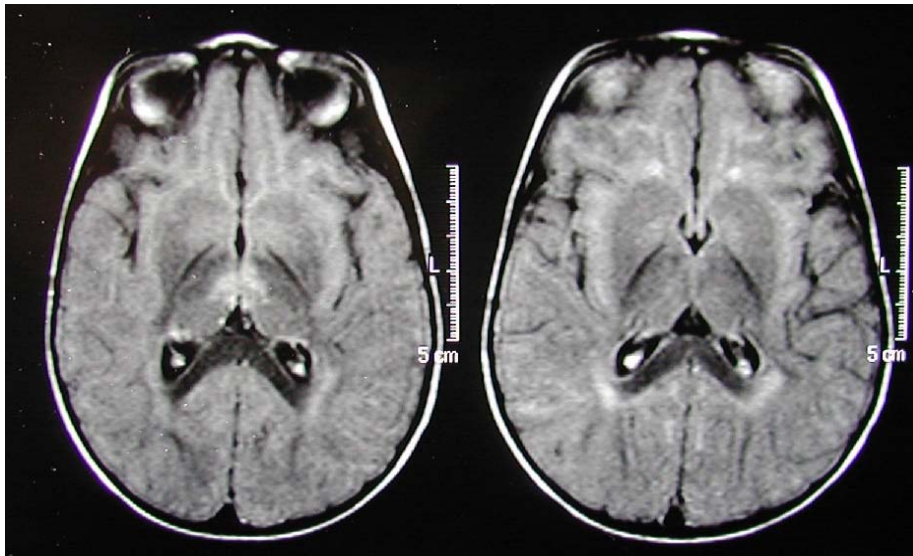


Figure 1 Flowchart of molecular investigation performed in the present study



*Figure 2: a) Detection of T8993G on mtDNA. Lane 1 and 10: 1 kb and 100bp ladders respectively; lane 2: negative control (no DNA sample); lane 3: negative control; lanes 4, 5, 6, 8, and 9: patients that do not carry this mutation; lane 7: patient that carry the T8993G mutation. b) Southern blot analysis of mtDNA. Lane 1: positive control; lane 2: negative control; lane 3: undigested sample from patient with deletion in mitochondrial DNA; Lane 4: sample from a patient with a deletion in mitochondrial DNA; lanes 5 and 6: samples from patients that do not carry a deletion on their mitochondrial DNA.*



*Figure 3 MRI of brain showing bilateral symmetrical hypointense signal abnormality in midbrain on Flair weighted.*

## **Capítulo III**

### **QUANTITATIVE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA DELETION BY REAL-TIME PCR: APLICATION TO DIAGNOSIS OF MITOCHONDRIAL DISORDERS**

---

---

**QUANTITATIVE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA DELETION BY  
REAL-TIME PCR: APLICATION TO DIAGNOSIS OF MITOCHONDRIAL  
DISORDERS**

Carolina Fischinger Moura de Souza<sup>1,2</sup>, Leticia Saldanha Laybauer<sup>1</sup>, Hugo Bock<sup>1</sup>, Marcele Cerski<sup>3</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>, Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>1,4</sup>

(Submetido ao Journal of Inherited Metabolic Disease)

<sup>1</sup> Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Interna, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Running title:** Quantitative real-time PCR for detecting mitochondrial DNA deletion

**Keywords:** Mitochondrial DNA, mtDNA deletions, real-time PCR

Address Correspondence to:

Dra. Maria Luiza Saraiva-Pereira

Serviço de Genética Médica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55-51-2101-8011; Fax: +55-51-2101-8010

e-mail: [mlpereira@hcpa.ufrgs.br](mailto:mlpereira@hcpa.ufrgs.br)

---

**Abstract**

Mitochondrial disorders are a heterogeneous group of diseases with multisystem presentation. Clinical phenotype of these disorders is highly dependent on residual mtDNA concentration in tissue. Real-time PCR has been proposed to quantify mtDNA copy number and is now an impressive tool for quantifying deleted mtDNA in tissues. In this study we compare results obtained by a qualitative (Southern blot analysis) and a quantitative methodology (real-time PCR) in order to demonstrate the advantage of combining both techniques. The aim of the present investigation was to quantify mtDNA deletions in muscle tissues from patients with mitochondrial disorders and correlate the amount of deleted mtDNA with onset of symptoms and clinical phenotype. We analysed 11 patients (3 patients with KSS, 2 patients with CPEO, 1 patient with Pearson syndrome and 5 patients with multisystemic manifestations) with single or multiple mtDNA deletions detected by Southern Blot. Most samples had high percentage of mtDNA deletions (>36%), except the patient with multiple deletions. No correlation was found between phenotype and onset of symptoms in this study. Real-time PCR can determine the relative percentage of either deleted or full-length mtDNA patients with mitochondrial diseases and has advantages over classic Southern blot analysis, but is essential a careful interpretation of results in patients with multiple deletions. This method can be applied not only in the detection of mitochondrial disorders as well as in the evaluation of deletions in mtDNA in neurodegenerative disorders.



---

## Introduction

Mitochondrial disorders form a heterogeneous group of diseases with multisystem presentation that affect mitochondrial ATP production. More than 200 disorders are associated with specific point mutations or single deletions in mtDNA. (<http://www.mitomap.org>). Two broad classes of mtDNA mutations are known: large-scale rearrangements and maternally inherited point mtDNA mutations (Zeviani and Antozzi 1997). Rearrangements are responsible for typical clinical phenotypes such as Kearns-Sayre's syndrome (KSS), chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), and Pearson's syndrome. Onset of symptoms in KSS occurs before 20 years of age and the disease is characterized by ophthalmoplegia, retinitis pigmentosa, cardiac conduction defects, cerebellar ataxia and high levels of protein in liquor, while patients with PEO present ocular symptoms and, eventually, fatigue and myopathy signs. Patients with Pearson syndrome begin onset of symptoms around 12 months of age, with pancytopenia, renal tubular insufficiency, lactic acidosis, leading to an early death by sepsis. When a patient with Pearson syndrome survives phenotype is similar to KSS (Zeviani and Carelli 2003). However, a great part of patients that carry a deletion in mtDNA show an atypical clinical features with multisystem involvement, where several organs and systems are affected such as endocrinological (diabetes mellitus, thyroid and parathyroid dysfunction, low stature), gastrointestinal (chronic vomiting, intestinal pseudo-obstruction, malabsorption), renal (tubulopathy and renal Fanconi), haematological (bone marrow insufficiency), ocular (optic atrophy, ophthalmoplegia, ptosis) beyond muscular involvement.

Pathogenic mtDNA mutations (including deletions) are frequently heteroplasmic, with mutant and wild type mtDNA coexisting in the same cell. The ratio of wild type to mutant mtDNA is critical in determining the expression of the genetic defect. All studies carried out to date have shown that is necessary at least 60% of deleted mtDNA in order to reveal a mitochondrial disorder in a specific organ (Boulet et al 1992; Chabi et al 2003).

To date qualitative or quantitative diagnosis of mtDNA disorders including quantification of the heteroplasmy has been carried out mainly by standard methods such as Southern blot analysis. Quantitative RT-PCR has been proposed to quantify mtDNA copy number and is now an impressive tool for quantifying deleted mtDNA in tissues (He et al 2002).

In this study we compare results obtained by a qualitative (Southern blot analysis) and a quantitative methodology (real-time PCR) in order to demonstrate the advantage of combining these techniques.

The aim of the present investigation was to quantify mtDNA deletions in muscle tissues from patients with mitochondrial disorders, and correlate with age at onset and clinical phenotype.

---

## Material and Methods

### *Patients and DNA samples*

Sample population was composed by 23 patients with clinical suspicion of mtDNA disorder who underwent muscle biopsy. Genomic DNA was extracted from both peripheral blood and 20 mg of frozen muscle, using standard methods (Miller et al 1988).

All patients included in this study were previously tested for common point mutations in leukocyte mtDNA (A3243G, T3271C, A8344G, T8356C and T8993G/C) (Souza et al 2005). Muscle biopsies of all patients were also submitted to histochemical analysis for standard stains such as modified Gomori-trichrome to characterize the morphology of the muscle fibres and to identify RRF, succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (COX) (Souza et al 2005).

### *Southern blot*

Southern blot was performed in all muscle samples. Five µg of total genomic DNA isolated from skeletal muscle was linearised using a restriction endonuclease (*PvuII*). Southern blot analysis was performed using the ECL™ Direct nucleic acid labelling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech), according to manufacture's instructions. In this study, two probes were generated by PCR amplification corresponding to different regions of the human mtDNA sequence (Anderson et al 1981). Probe 1 spans from nt 16130 to nt 500 in the D-loop region, while probe 2 covers from nt 4120 to nt 5050,

---

encompassing the genes encoding ND1, the tRNAs for Ile, Gln, and Met, and ND2 (Zeviani et al 1988).

### *Real-time PCR*

Patients who were found to carry a deletion in mtDNA were further analysed by RT-PCR, based on the TaqMan® methodology. RT-PCR assay was designed for detecting ND1 and ND4 sequence as described previously (He et al 2002). ND1 region was used as an internal reference, while ND4 gene was the target region. PCR primers and fluorogenic probes were designed using commercially available Primer Express software. Forward primers are 5'CCCTAAAACCCGCCACATCTAC3', for ND1, and 5'CCTCAACCCCGACATCATTACC3', for ND4. Reverse primers are 5'GCGATGGTGAGAGCTAAGGT3', for ND1, and 5'GCCTCTGTTGTCAGATTCACAATC3', for ND4. Probes are 5'CATCACCCCTCTACATCACCC3', for ND1 and 5'TTTACAAGAGGAAAACCC3' for ND4. Amplification of ND1 and ND4 regions of mtDNA were performed separately. PCR amplification was performed in a 12.5 µL volume containing 25 ng of DNA sample, 1X TaqMan® Universal PCR MasterMix, 3.6nM of each primer, and 1.0nM of fluorogenic probe. PCR conditions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation for 15s at 95°C, annealing/extension for 60s at 60°C. All reactions were performed at least in duplicate. The amplification and detection of the fluorescent signal intensities were performed using with an ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) and SDS (Ver. 2.2) software.

### *Statistical Analysis*

The Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare means for independent samples, since continuous variables analysed here did not have a normal distribution.

## Results

### *Detection of mtDNA deletions by Southern blot analysis*

Deletion in mtDNA was detected in 12 of 23 patients (52.2%). From those, 11 patients showed a single deletion while in 1 patient multiple deletions were identified (data not shown).

### *Quantification of heteroplasmy in mtDNA*

This methodology was applied to 11 patients only; biological material was not available from one patient with a single deletion.

To determine the proportion of deleted mtDNA, the number of cycles (Ct) necessary to detect intact mtDNA was subtracted from that needed for detecting deleted mtDNA ( $\Delta Ct = Ct_{ND1} - Ct_{ND4}$ ).  $\Delta Ct$  value can be used to determine the relative amount of ND1 to ND4 with the following equation:  $R = 2^{\Delta Ct}$ , where  $R$  is the calculated relative copy number (He et al 2002). Percentages of deletion in each patient are shown in Table 1.

In summary, 5 of 10 patients harbouring single deletions according to results from Southern blot analysis showed high levels of deleted mtDNA (>60%). Patient 9, that carry multiple deletions, showed only 14.7% of deleted mtDNA.

### *Correlation of clinical phenotype and mtDNA deletion*

Table 1 summarizes clinical and molecular features of patients harbouring single or multiple large scale deletions.

Among these 11 patients, 6 patients presented classical syndromes, 3 patients with KSS (patients 2, 6, and 7 – Table 1), 2 patients show CPEO (patients 3, and 4 – Table 1) and 1 patient presented Pearson syndrome (patient 11 – Table

---

1). The remaining 5 patients (patients 1, 5, 8, 9, and 10 – Table 1) showed multisystemic manifestations associated with mitochondrial encephalomyopathy (MEM).

The rate of mtDNA deletion found among patients with classical phenotype is higher than in patient with multisystemic manifestations; however, no statistical differences were found ( $p=0.144$ ). Patients with PEO presented a slightly higher amount of deleted mtDNA when compared to KSS and MEM (figure 1).

*Correlation between age of onset and percentage of deleted mtDNA*

Age of onset of symptoms varied from 1 to 18 years. Results showed that 8 patients presented symptoms up to 12 years-old (paediatrics patients) while 3 patients had onset after this age (teenager patients). No statistical differences were found between the relative percentage of deleted mtDNA among paediatric and teenager patients ( $p=0.683$ ).

## Discussion

Southern blot analysis is now an established method for determining the amount of deleted mtDNA (Zeviani et al 1988; Wong 2004). In the present study, muscle DNA samples with various amounts of deleted mtDNA were analysed by Southern blot and then confirmed by real-time PCR. We have found a significant correlation between intensity of fragments in Southern blot analysis and percentages of deleted mtDNA estimated by real-time PCR methodology. All muscle samples from patients with a known mtDNA deletion by Southern blot technique had high  $\Delta$ Ct values, corresponding to high levels of deletion (> 36%) except patient number 9 that had multiple deletions and showed low  $\Delta$ Ct (14.7%). Patient 10 showed a relative quantity of mtDNA below the expected rate, since this patient show a clinical phenotype of involvement of multiple organs associated to a progressive neurodegeneration. In this case, the deletion can be located outside the ND4 region or, alternatively, this patient can have multiple deletions which were not detected by Southern blot analysis. Real-time PCR sensibility was not assessed in this study. This technique was validated previously and correlated with two other techniques: Southern blot and three-primer competitive PCR. Validation process demonstrated that this technique is very sensitive to quantify the level of deleted mtDNA molecules in individual cells.

Intra-assay variability for each template (two separate experiments with two independent observations) was < 1.5% for both templates which indicates a high reproducibility in these experiments. We have also determined the variability between assays by measuring Ct of the ND1 and ND4 templates in two separate experiments; the maximum variability for the ND1 template was



---

1.9% for ND1 and 1.5% for ND4 template. Intra-assay variability can be minimized using both ND1 and ND4 probes in the same reaction tube.

This study demonstrated that real-time PCR shows several advantages when compared to Southern blot analysis. Nevertheless, further experiments have to be carried out to correlate both techniques due to the difficulty of interpreting positive or negative results in patients with multiple deletion (He et al 2002). Furthermore, it remains to be evaluated the effect of cells aging on introducing sporadic deletions in mtDNA that have to be considered when adults patients require this type of analysis (Cassano et al 2004).

No statistical difference was found in percentage of deleted mtDNA between the group of patients with classical phenotype or onset below 12 years of age with the group of patients with multisystemic clinical signs. This fact is probably due to the limited number of patients analysed that might not be sufficient to show a correlation. It remains possible that no correlation can be detected between relative amount of deleted mtDNA and various clinical phenotypes by this methodology.

Real-time PCR was also performed in leukocytes DNA in patient 11 (a patient with Pearson syndrome) but results obtained did not allowed the establishment of a diagnosis. Previous data showed that Southern blot is able to detect deletion in mtDNA isolated from peripheral blood (Akman et al 2004; Bai and Wong 2004).

In conclusion, as far as we are aware, this is the first study that compares amount of deleted mtDNA through real-time PCR with patient clinical phenotype and age of onset of symptoms. These preliminaries results presented here indicate that this methodology seems to be highly reproducible and has high

sensitivity. Yet, we believe that the combination of both real-time PCR and Southern blot is essential for elucidating a diagnosis mainly in cases of patients with multiple deletions. Additionally, the use of real-time PCR as a screening methodology for detecting deletions in mtDNA has the advantage of requiring a tiny amount of muscle DNA and gives a result in only few hours, being less time-consuming than any other technique.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to parents and patients who allowed this study to be performed. This work was supported by grants from Brazilian Funding Agencies (PRONEX-MCT, CNPq, FINEP/HCPA, PROPESQ/UFRGS). We also thank CAPES/ICCTI for supporting training activities.

## References

Akman CI, Sue CM, Shanske S, Tanji K, Bonilla E, Ojaimi J, Krishna S, Schubert R, DiMauro S (2004) Mitochondrial DNA deletion in a child with megaloblastic anemia and recurrent encephalopathy. *J Child Neurol* **19**: 258-61.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-65.

Bai RK, Wong LJ (2004) Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach. *Clin Chem* **50**: 996-1001.

Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA (1992) 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* **51**: 1187-200.

Cassano P, Lezza AM, Leeuwenburgh C, Cantatore P, Gadaleta MN (2004) Measurement of the 4,834-bp mitochondrial DNA deletion level in aging rat liver and brain subjected or not to caloric restriction diet. *Ann N Y Acad Sci* **1019**: 269-73.

Chabi B, Mousson de Camaret B, Duborjal H, Issartel JP, Stepien G (2003) Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: application to diagnosis. *Clin Chem* **49**: 1309-17.

He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM (2002) Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e68.

---

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215.

Souza CFM, Laybauer SL, Copetti N, Cruz BM, Cerski M, Pereira MLS, Giugliani R (2005) Diagnosis of mitochondrial disorders: application of a DNA-based protocol in selected patients. *Submitted to Journal of Medical Genetics*.

Wong LJ (2004) Comprehensive molecular diagnosis of mitochondrial disorders: qualitative and quantitative approach. *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 246-58.

Zeviani M, Antozzi C (1997) Mitochondrial disorders. *Mol Hum Reprod* **3**: 133-48.

Zeviani M, Carelli V (2003) Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* **16**: 585-94.

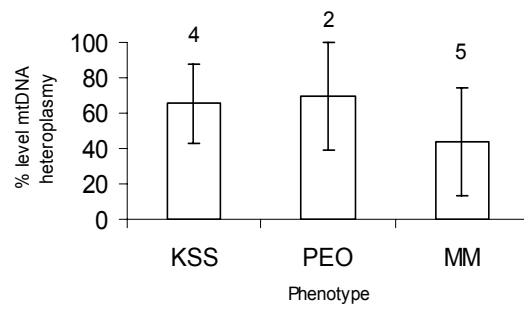
Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP (1988) Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* **38**: 1339-46.

**Table 2.** Clinical and molecular features of patients harbouring single or multiple large scale deletions

Patient	Sex	Clinical phenotype	Age of onset symptoms (years)	Age of muscle biopsy (years)	Histochemistry	Deletions (southern blot)	% deleted mtDNA (real time-PCR)
1	F	Diabetes mellitus, hypoparathireoidism, short stature, basal ganglia calcifications, ataxia, CPEO, seizures. Progressive neurological degeneration, lactic acidosis, renal tubulopathy. (MEM)	2	10	Fibers atrophy, positive for RRF, normal SDH, COX-negative fibers.	Single	74.3
2	F	Kearns-Sayre syndrome	5	12	Positive for RRF, SDH-intense, COX-positive fibers.	Single	51.7
3	M	CPEO, weakness	13	35	Negative for RRF, normal stain for SDH and COX.	Single	47.6
4	M	CPEO	16	30	Positive for RRF, normal SDH, COX-negative fibers.	Single	90.8
5	F	Pigmentary retinopathy, short stature, developmental delay, cerebral atrophy, myopathy, vomiting, lactic acidosis, ataxia, sensorineural deafness. (MEM)	4	10	Fibers atrophy, positive for RRF, normal stain for SDH and COX.	Single	77.8
6	M	Kearns-Sayre syndrome	15	20	Fibers atrophy, positive for RRF, SDH-intense, COX-negative fibers.	Single	92.2
7	M	Kearns-Sayre syndrome	18	32	Fibers atrophy, positive for RRF, normal stain for SDH and COX.	Single	74.9

8	M	Myopathy, progressive neurological deterioration. (MEM)	12	18	Negative for RRF, normal stain for SDH and COX.	Single	36.3
9	M	Lactic acidosis, developmental delay, low stature, progressive neurological deterioration. (MEM)	17	39	Fibers atrophy, positive for RRF, normal stain for SDH, COX-negative fibers.	Multiple	14.7
10	M	CPEO, ataxia, sensorineural deafness, basal ganglia calcification. (MEM)	7	10	Fibers atrophy, positive for RRF, SDH-intense, COX-negative fibers.	Single	15.5
11	F	Pearson Syndrome	1	1.6	Fibers atrophy, Negative for RRF, Normal stain for SDH, COX-negative fibers.	Single	43.3

F: female; M: male; CPEO: chronic progressive external ophthalmoplegia; MEM: mitochondrial encephalomyopathy; RRF: ragged red fibers on Gomori trichrome stain; SDH: succinate dehydrogenase, COX: cytochrome c oxidase.



**Figure 1:** Phenotype comparison of mtDNA deletion levels  
KSS- Kearns- Sayre syndrome, PEO- Progressive external  
ophthalmoplegia, MEM-mitochondrial encephalomyopathy



## **Capítulo IV**

**CONVENTIONAL MRI AND MR SPECTROSCOPY IN NON-  
CLASSICAL MITOCHONDRIAL DISEASE:  
REPORT OF THREE PATIENTS WITH MITOCHONDRIAL  
DNA DELETION**

---

---

**CONVENTIONAL MRI AND MR SPECTROSCOPY IN NON-CLASSICAL  
MITOCHONDRIAL DISEASE:  
REPORT OF THREE PATIENTS WITH MITOCHONDRIAL DNA DELETION**

Carolina Fischinger Moura de Souza<sup>1,2</sup>, Leonardo Vedolin<sup>3</sup>, Rogério Schwark<sup>3</sup>,  
Leticia Saldanha Laybauer<sup>1</sup>, Maria Luiza Saraiva Pereira<sup>1,4</sup>, Roberto Giugliani<sup>1,2</sup>

(Submetido a American Journal of Neuroradiology)

<sup>1</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Neuroradiology Department, Mãe de Deus Center and Hospital Mãe de Deus;

<sup>4</sup> Biochemistry Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Address Correspondence to:**

Dr. Carolina Fischinger Moura de Souza

Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-903

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55-51-2101-8011; Fax: +55-51-2101-8010

e-mail: [cfsouza@hcpa.ufrgs.br](mailto:cfsouza@hcpa.ufrgs.br)

**Summary**

We describe MRI and MRS findings in 3 patients with deletion on mtDNA and non-classical mitochondrial disorders, correlating these neuroimaging findings with the percentage of deleted mtDNA. Our findings showed that MRS is a useful investigational tool in patients with suspected mitochondrial disorders, even in those with a non-classical phenotype. Supplementary studies are necessary to elucidate the correlation of quantitative mtDNA deletion and neuroimaging phenotype.

**Key Words:** Magnetic resonance spectroscopy, mitochondrial disease, mtDNA

## Introduction

Mitochondrial diseases (MD) are a genetically, biochemically, and clinically heterogeneous group of clinical disorders caused by a large variety of defects in mitochondrial energy metabolism (1, 2).

MD are caused either by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA), or by nuclear DNA mutations. Two broad classes of mtDNA mutations are known: large-scale rearrangements (mtDNA deletions or duplications), and maternally inherited point mtDNA mutations (2). Normally, patients with mtDNA deletions present with classic phenotypes such as Kearns Sayre syndrome (KSS), chronic progressive external opthalmoplegia (CPEO) and Pearson's syndrome. However, clinical presentation of mtDNA deletion syndromes in infants and young children can be quite heterogeneous. Patients may present with a broad spectrum of clinical symptoms that cannot be classified in a typical pattern of any known syndrome (3, 4). mtDNA mutations (including deletions) are frequently heteroplasmic, with mutated and wild-type mtDNA coexisting in different amounts within the cell, and consequently within affected tissues. The clinical phenotype of MD is highly dependent on tissue specific residual mtDNA concentration (5).

Diagnosis of MD is based on clinical, biochemical, neuroradiological and molecular mtDNA analysis (6). According to the patient's clinical phenotype, classical or non-classical, a rational investigational strategy, sometimes including invasive testing such as muscle biopsy, should be put in place.

Brain magnetic resonance imaging (MRI) is the most sensitive imaging modality for the detection of CNS abnormalities such as cerebral atrophy, white matter (WM), basal ganglia (BG) and brain stem lesions. (7, 8) Metabolites changes in magnetic resonance spectroscopy (MRS) such as reduced NAA/Cr ratio and lactate peak have also been described in a limited number of MD case-report studies (9, 10) Little is known, however, about the sensitivity of either technique or about the correlation of neuroimaging, clinical and molecular findings in non-classical MD. The purpose of this study was to describe MRI and MRS findings in 3 patients with mtDNA deletion and non-classical MD phenotype. Detection of mtDNA deletions were carried out with Southern Blot analysis. Quantification of heteroplasmic percentage of mtDNA was done using real time PCR

## Case Reports

### Patient 1:

A 12 year-old female, the second daughter of healthy nonconsanguineous parents, without a family history of genetic disorders, was brought to evaluation at 2 years of age due to short stature and mild developmental delay. She evolved with recurrent episodes of lactic acidemia combined with progressive ataxia, sensorineural deafness, abnormal EEG, hypoparathyroidism, insulin-dependant diabetes mellitus, progressive ophthalmoplegia, and renal tubular acidosis. At age 10, she underwent a muscle biopsy which revealed a primary myopathy with Ragged Red Fibres (RRF). Molecular analysis detected a single mtDNA deletion with a relative quantification of 74.3%. Brain MRI showed cerebral atrophy and diffuse hyperintense lesions on T2 and FLAIR weighted images in the brain stem (dorsal medulla, pons and midbrain), cerebellum and subcortical WM (figure 1a). Caudate head, thalamus and periventricular presented mild white matter mild compromise. Putamen and globus pallidus signal intensity were normal. After MRI, a volume of interest (VOI) for MRS, measuring 8 cm<sup>3</sup> was positioned within the right lentiform nucleus. A long TE (135 ms), point-resolved spectroscopy (PRESS) was used. The n-acetyl-aspartate/creatine (NAA/Cr) ratio was moderately reduced and choline/creatine (Cho/C) ration was mildly increased. At 1.3 ppm, an inverse doublet peak consistent with lactate was detected (figure 1b).

### Patient 2:

This patient was a 13-year-old white female, the only daughter of a healthy nonconsanguineous couple without a positive family history for genetic diseases. She was brought to a genetics clinic at age 4 due to psychiatric symptoms (hallucinations, severe depression), ataxia and progressive pigmentary retinopathy. She developed cyclic vomiting, which led to a gastrostomy, severe myopathy, and progressive deterioration of both cognitive and psychomotor symptoms with the onset of seizures. Epilepsy was eventually controlled with anticonvulsive therapy. Recent examination showed short stature, ophthalmoplegia, abnormal visual and auditory evoked potentials, and metabolic decompensations with significant lactic acidosis. Her muscle biopsy reveals a primary myopathy with RRF and COX deficiency. mtDNA analysis

confirmed the presence a single deletion and a relative quantification of 77.8%. Brain MRI showed mild and scattered WM lesions (figure 2a). There were no lesions on basal ganglia, brain stem or cerebellum. MRS (PRESS, TE 135 ms at the right lentiform nucleus), showed a moderate reduction of the NAA/Cr ratio, a lactate peak and a mild increase in the Cho/Cr ratio (figure 2b).

### **Patient 3:**

This was an 11-year-old white male, the only son of a healthy nonconsanguineous couple of negative genetic family history. Clinical evaluation began at age 7 due to the presence of sensorineural deafness. He developed progressive ataxia (currently unable to walk unaided), bilateral ptosis, progressive ophthalmoplegia, pigmentary retinopathy, and abnormal cardiac electric conduction. Endocrine, electromyographic evaluations were normal. Despite physical limitations he is able to attend regular school. Molecular analysis revealed a simple mtDNA deletion with a relative quantification of 15.5%. Brain MRI showed severe hyperintense lesions on T2 and FLAIR weighted images in the dorsal brain stem, cerebellum, subcortical WM, caudate head, globus pallidus and thalamus (figure 3a and 3b). There was no cerebral or cerebellar atrophy. On MRS (PRESS, TE 135 ms at the right lentiform nucleus), a lactate peak was identified (figure 3c). The NAA/Cr and Cho/Cr ratios were normal.

## **Discussion**

### *General Findings*

Patients with mtDNA deletion disorders can present with a constellation of non-specific symptoms. Our findings suggest that even patients with non-classical MD have a lactate peak, brain atrophy, and cerebral lesions. MRS proved to be a sensitive tool to detect metabolite abnormalities in this group of disorders. Our results support the use of MRS as part of the work up for patients with suspected MD, especially as an ancillary exam in determining the precise indication of muscle biopsy for molecular diagnosis. We find that a neuroradiologic evaluation is key to the investigational process, since clinical

presentation of mitochondrial DNA disorders is quite diversified, with initial symptoms very often not fitting a specific clinical picture.

#### *Findings on Conventional MRI*

Neuroimaging findings in MD have been described in a small number of case report papers. Brain lesions are characterized by spongiform vacuolization, neuronal loss with associated gliosis, and focal microcystic cavities (11). Our study confirms the high prevalence of WM lesions in non-classical MD, ranging from mild to severe involvement. Lesions were hyperintense in T2 and FLAIR weighted images, diffusely affecting the WM and having no mass effect or lobar predominance. The subcortical WM was more frequently and severely affected. Awareness of this imaging pattern is very important when considering possible differential diagnosis predominantly involving WM, such as Alexander, Canavan and vanishing white matter diseases.

Basal ganglia lesions were also common in MD. Two of the patients had bilateral symmetrical lesions. We found the caudate, the thalamus and the globus pallidus to be more frequently affected. None of the patients had isolated putaminal lesions. Basal ganglia involvement is frequent in MD, a finding that could be important to distinguish MD from other leukodystrophies.

Posterior fossa lesions were also frequent. The most frequently compromised locations in the brain stem were dorsal medulla and pons. The midbrain was also affected, usually around the periaqueductal region, red nucleus and cerebral peduncle. The cerebellum was affected in 2 of the patients, mainly in the WM lesions, superior and middle cerebellar peduncle. Interestingly, cerebellar atrophy was not as common as cerebral atrophy.

#### *Findings on Spectroscopy*

The most frequent MRS abnormalities described in MD are reduced n-acetyl-aspartate/creatine (NAA/Cr) and choline/creatine (Cho/Cr) ratios, as well as an increased lactate peak. Bianchi *et al*, in a prospective study of 15 MD patients, described the increased lactate peak to be almost always restricted to areas showing signal abnormalities (7). We found MRS to be more sensitive than conventional MRI when investigating MD since all patients had MRS abnormalities in the basal ganglia. A lactate peak was the most frequent finding.

---

As we used a long TE, we could not evaluate the presence of other peaks such as myoinositol, lipids and amino acids. Our results suggest that MRS should be used in patients with mitochondrial encephalopathy since presence of a lactate peak could be more sensitive than conventional brain MRI.

*Imaging x Clinical Correlation.*

Our patients presented moderate to severe neurological manifestations and an elevated lactate peak. These findings are in accordance with the results of Bianchi et al (7). Those authors found correlation between severity of clinical involvement, MRI findings and lactate peak. Considering age of onset and severity of symptoms in our three patients, we believe MRI findings to be compatible with their neurological signs. All our patients also presented significant lactic acidemia.

The relationship between quantitative deleted mitochondrial DNA and clinical course in MD patients is poorly understood. All studies carried out to date have shown that a percentage of mutated or deleted mtDNA > 60% is necessary to reveal a mitochondrial chain defect in a specific organ (12). A different study, however, did not find correlation between quantitative DNA deletion and clinical course in a 10 year old patient with KSS (13). We found a wide range of mtDNA deletions in our patients. Patients 1 and 2 had more than 60% of mtDNA deleted, but patient 3 lacked only 15.5%. These results suggest that the degree of mtDNA deletion do not correlate with the clinical course; in this case, rapidly progressive neuromuscular damage. In a scenario like this, neuroimaging findings could be a more sensitive tool to monitor disease severity and lesion progression, even in non-classical MD patients.



**Conclusion**

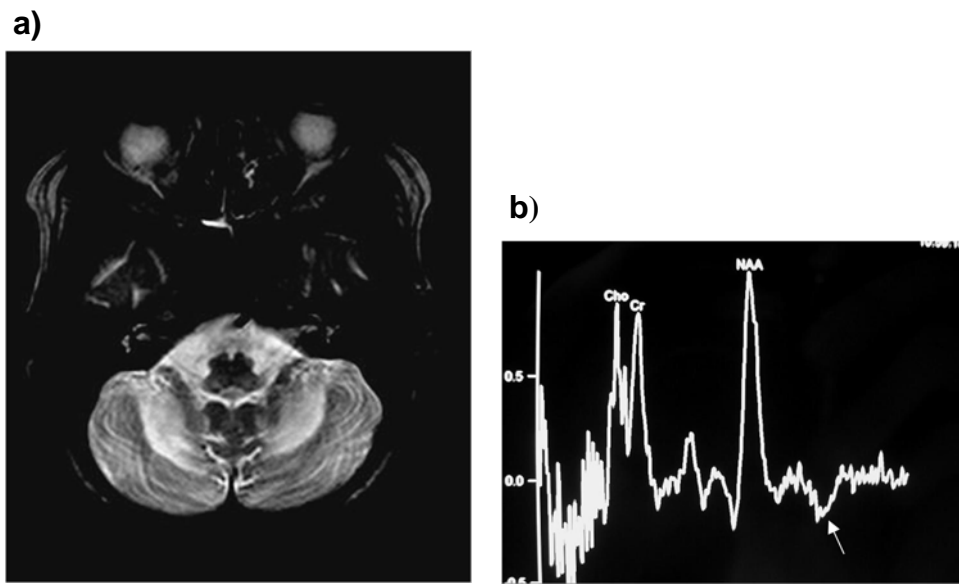
This report confirm that MRS is a useful investigational tool in patients suspected of having MD, as it supplies additional information to those generated by conventional imaging studies. Even in patients with non-classical phenotypes of mitochondrial diseases, MRS demonstrated to be more sensitive than MRI. Additional diagnostic value of this technique is given by the finding of a lactate peak, not necessarily during periods of acute exacerbation of symptoms. In our series, quantitative mtDNA deletion did not correlate with disease. Supplementary studies are necessary to elucidate the correlation of quantitative mtDNA deletion and neuroimaging phenotype and to further define the accuracy of MRS in non-classical MD.

---

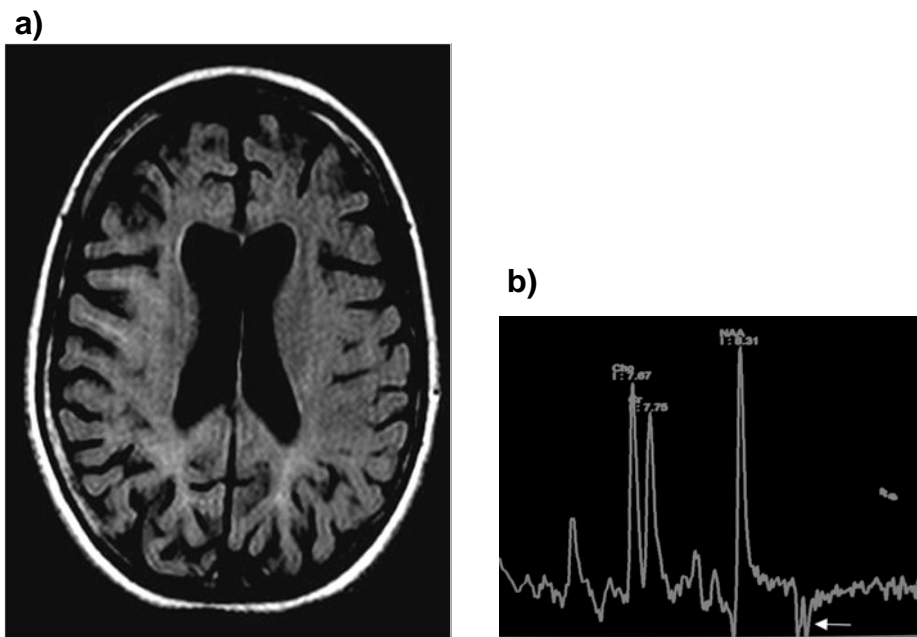
## References

1. Singhal N, Gupta BS, Saigal R, Makkar J, Mathur R. Mitochondrial diseases: an overview of genetics, pathogenesis, clinical features and an approach to diagnosis and treatment. *J Postgrad Med* 2000;46:224-230
2. von Kleist-Retzow JC, Cormier-Daire V, Viot G, et al. Antenatal manifestations of mitochondrial respiratory chain deficiency. *J Pediatr* 2003;143:208-212
3. Morgan-Hughes JA, Sweeney MG, Cooper JM, et al. Mitochondrial DNA (mtDNA) diseases: correlation of genotype to phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:135-140
4. DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004;1658:80-88
5. Bai RK, Wong LJ. Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach. *Clin Chem* 2004;50:996-1001
6. von Kleist-Retzow JC, Schauseil-Zipf U, Michalk DV, Kunz WS. Mitochondrial diseases--an expanding spectrum of disorders and affected genes. *Exp Physiol* 2003;88:155-166
7. Bianchi MC, Tosetti M, Battini R, et al. Proton MR spectroscopy of mitochondrial diseases: analysis of brain metabolic abnormalities and their possible diagnostic relevance. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:1958-1966

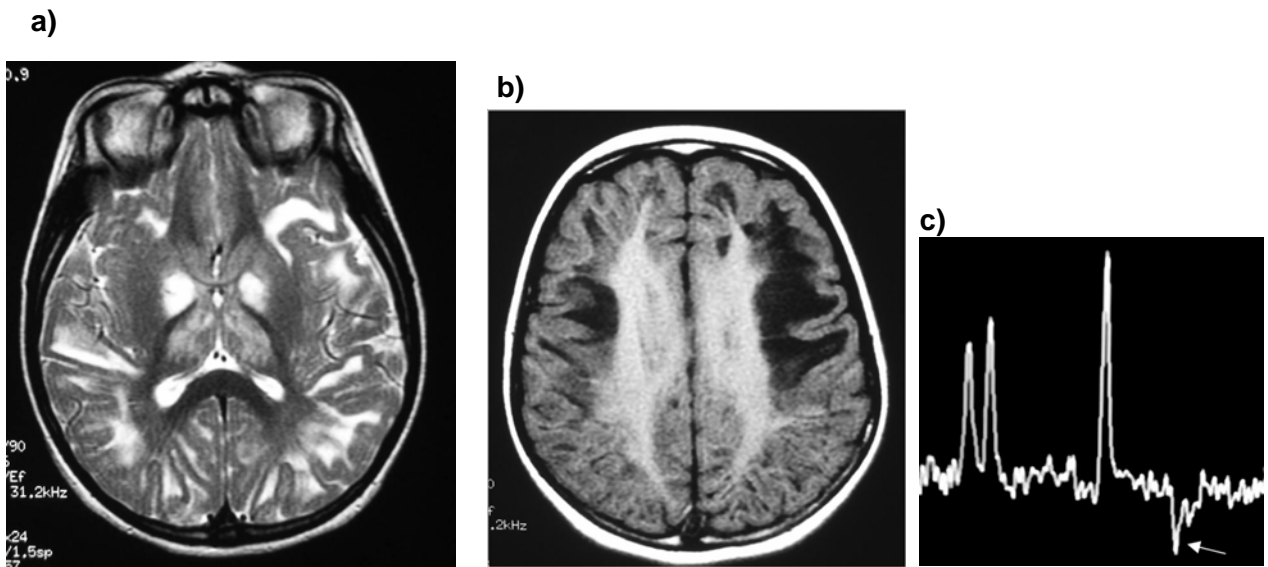
8. Munoz A, Mateos F, Simon R, Garcia-Silva MT, Cabello S, Arenas J. Mitochondrial diseases in children: neuroradiological and clinical features in 17 patients. *Neuroradiology* 1999;41:920-928
9. Leutner C, Layer G, Zierz S, Solymosi L, Dewes W, Reiser M. Cerebral MR in ophthalmoplegia plus. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994;15:681-687
10. Kuwabara T, Watanabe H, Tanaka K, et al. Mitochondrial encephalomyopathy: elevated visual cortex lactate unresponsive to photic stimulation--a localized 1H-MRS study. *Neurology* 1994;44:557-559
11. Sparaco M, Bonilla E, DiMauro S, Powers JM. Neuropathology of mitochondrial encephalomyopathies due to mitochondrial DNA defects. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:1-10
12. Chabi B, Mousson de Camaret B, Duborjal H, Issartel JP, Stepien G. Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: application to diagnosis. *Clin Chem* 2003;49:1309-1317
13. Ishikawa Y, Goto Y, Ishikawa Y, Minami R. Progression in a case of Kearns-Sayre syndrome. *J Child Neurol* 2000;15:750-755



**Figure 1:**(a) Brain MRI showing cerebral atrophy and diffuse hyperintense lesions on T2 and FLAIR weighted images in the brain stem (dorsal medulla, pons and midbrain), cerebellum and subcortical WM; (b) Inverse doublet peak, at 1,3 ppm, consistent with lactate.



**Figure 2:** (a) Brain MRI showing mild and scattered WM lesions; (b) Moderate reducing NAA/Cr ratio, a lactate peak and a mild increased Cho/Cr ratio



**Figure 3:** (a) Axial T2-weighted image showing high signal intensity in basal ganglia, thalamus and white matter; (b) Axial T1-weighted image showing subcortical white matter lesions in frontal lobes; (c) MRS showing a lactate peak (arrow)

# **Capítulo V**

## **5- DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

### **5.1. Delineamento do estudo**

O estudo realizado é uma série de casos selecionados conforme a conveniência do pesquisador. Essa forma de seleção conduz, muitas vezes, a uma série de vieses de seleção, visto que contamos com informações retrospectivas e casos previamente investigados. No sentido de amenizar alguns problemas metodológicos, todos os casos foram submetidos ao mesmo protocolo (Anexo 1) e avaliados sempre pelo mesmo pesquisador.

Apesar dos esforços, nem todas as informações e dados das diversas variáveis estudadas foram obtidos; alguns por dificuldade inerente do exame como, por exemplo, a biópsia de músculo, e outros pelas dificuldades técnicas ou pelos custos envolvidos.

### **5.2. Amostra estudada**

A maioria dos pacientes submetidos ao protocolo de investigação clínica e molecular foi proveniente dos ambulatórios de especialidades do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, refletindo uma amostra regionalizada, o que já era esperado para este tipo de estudo.

Apesar da grande variação da idade da amostra estudada (0 a 53 anos), a diferença obtida entre a idade média do início dos sintomas (7 anos) e a média de idade para o início da investigação (14 anos) dirigida para as doenças mitocondriais, demonstra o desconhecimento dessa patologia em nosso meio, o que dificulta uma investigação diagnóstica dirigida mais precoce.

Outro dado que merece atenção, foi o número total de pacientes que foram a óbito no decorrer do estudo (7/43), demonstrando, que diante de um paciente com patologia multissistêmica associado a um quadro neurodegenerativo, é fundamental uma estratégia diagnóstica concisa na busca de um rápido resultado conclusivo.



### **5.3. Investigação clínico-laboratorial: comentário geral sobre o protocolo utilizado**

No presente estudo, foram investigados 43 pacientes com suspeita clínica de doença mitocondrial, tendo sido identificada uma mutação no mtDNA em 17 casos (39,5%). Esse índice de sucesso, obtido após uma criteriosa seleção clínica, foi observado em poucos trabalhos relatados até o momento. Em um trabalho que utilizou PCR multiplex para a detecção de 44 mutações de ponto no mtDNA em 2.000 amostras de sangue, músculo ou outros tecidos, foi identificada uma mutação em somente 5,4% dos pacientes com suspeita clínica (Liang e Wong, 1998). Tulinius e cols. (1991) estudaram ao longo de 4 anos 50 pacientes encaminhados ao seu ambulatório por suspeita de doença mitocondrial e, após a utilização de um protocolo que abrangia uma avaliação clínica, a análise bioquímica da atividade da cadeia respiratória e a investigação molecular, chegou a definição do diagnóstico em 20 pacientes, dos quais somente 8% apresentaram mutação no mtDNA (2 com deleção, 2 com mutação de ponto) (Tulinius e cols., 1991). Lamont e cols. (1998) estudaram uma amostra composta por 190 crianças, tendo sido confirmado diagnóstico molecular em somente 7,9% dos pacientes. Ao contrário desses, e em consonância com os nossos resultados, um trabalho mais recente realizado com 225 pacientes (crianças e adultos) evidenciou a presença de mutações patogênicas em 29% dos casos (Jaksch e cols., 2001). A diferença deste trabalho em relação aos outros foi a seleção clínica da amostra com a inclusão de informações da histoquímica e da bioquímica previamente à análise molecular. Além disso, foi realizado o seqüenciamento completo do genoma mitocondrial o que possibilitou, em muito, a ampliação do diagnóstico molecular (Jaksch e cols., 2001).

É notório que a taxa de sucesso no diagnóstico molecular é variável de um estudo para outro, visto que, na maioria dos trabalhos, as amostras são compostas somente por crianças ou somente por adultos. Além disso, muitos estudos incluem, na avaliação prévia ao estudo molecular, a análise histoquímica e a dosagem das enzimas da cadeia respiratória. No presente estudo, a amostra foi constituída de crianças, adolescentes e adultos, e o

protocolo incluiu apenas as avaliações clínicas, laboratoriais e os exames de imagem e função. A heterogeneidade da amostra e o formato do protocolo poderiam levar a uma dificuldade maior para se chegar ao diagnóstico. Contudo, os resultados obtidos demonstraram que, não somente a aplicação do protocolo proposto foi eficaz, como valorizou a investigação clínica realizada.

Por outro lado, o padrão de mutações encontrado no mtDNA do presente estudo (12 pacientes com deleções simples ou deleção múltipla, 4 pacientes com mutação de ponto A3243G e fenótipo de MELAS e 1 paciente com mutação T8993G e fenótipo de síndrome de Leigh) está de acordo com a descrição de outros trabalhos. Em um estudo com 1.725 pacientes australianos nos quais foi aplicado um protocolo molecular semelhante ao deste estudo, com a diferença de que foram incluídas as mutações para a atrofia óptica de Leber (G11778A, T14484C, G3460A), os achados foram: 17,7% de pacientes com deleções no mtDNA, 6,17% com a mutação A3243G, 2,21% portadores da mutação A8344G e 0,32% com mutação T8993C (Marotta e cols., 2004). Em outro estudo, onde foram investigados 34 pacientes, 7 apresentavam mutações de ponto (4 A3243G, 2 A8344G e 1 T8993C) e 4 mostravam deleções no mtDNA (3 KSS e 1 síndrome de Pearson) (Skladal e cols., 2003). A maioria dos trabalhos mostra que a mutação de ponto mais freqüente no mtDNA é mesmo a A3243G, responsável pelo fenótipo de MELAS, mas já descrita para uma grande variabilidade de síndromes e sintomas clínicos. Contudo, os rearranjos no mtDNA também são encontrados com uma freqüência significativa em comparação a outras mutações de ponto. Não há dados suficientes na literatura sobre a real freqüência de deleções no mtDNA, visto que a investigação de uma mutação de ponto pode ser facilmente realizada em uma amostra de sangue, mas o estudo da deleção requer necessariamente uma amostra de tecido muscular. Por outro lado, a elevada freqüência de pacientes com deleção no mtDNA encontrada no presente estudo, reforça a necessidade da realização da investigação em tecido muscular. Além disso, o fenótipo clínico de um paciente com deleção no mtDNA parece ser mais característico do que nos pacientes com

mutações de ponto, o que motiva, muitas vezes, uma indicação mais precisa da biópsia muscular.

Apesar de não ser tão freqüente como a mutação A3243G, a mutação A8344G, é encontrada, em outros estudos (Kwon e cols., 2004; Marotta e cols., 2004). Uma explicação para não haver nenhum paciente com essa mutação no presente estudo, pode ser a característica amostral, visto que nenhum dos 24 pacientes (55,8%) com epilepsia manifestava mioclonias. Para complementar, apesar de mioclonia e ataxia serem manifestações comuns associadas à mutação A8344G, muitos indivíduos podem ser oligossintomáticos, o que leva o médico não-especialista a suspeitar menos de uma doença genética.

As mutações T3271C e T8356C também se mostraram mais raras ou mesmo ausentes nos pacientes investigados em outros estudos (Chinnery e cols., 1997; Kwon e cols., 2004).

No presente trabalho, o seqüenciamento do RNA transportador de lisina e de leucina não contribuiu para a detecção de novas mutações. Os resultados obtidos indicam que a contribuição limitada deste procedimento complementar deve ser levada em conta, principalmente, em função da relação custo-benefício. Trabalhos recentes sugerem que o seqüenciamento completo do genoma possibilita uma maior taxa de diagnóstico (Jaksch e cols., 2001). Contudo, esta estratégia é trabalhosa e de alto custo, e leva à detecção de polimorfismos cujos efeitos clínicos são ainda desconhecidos. Neste caso, para uma melhor correlação genótipo-fenótipo, estudos de expressão em modelos animais poderiam ser informativos.

Até pouco tempo atrás, a maioria dos autores considerava fundamental a inclusão da dosagem das enzimas da CRM no fluxograma de pacientes com suspeita clínica de mitocondriopatia. Contudo, revisões recentes têm dado ênfase à análise clínica criteriosa, com especial atenção ao fenótipo do paciente, à análise histoquímica e à investigação molecular do mtDNA. O que se observa é que a técnica para dosagem das enzimas da CRM é trabalhosa, de elevado custo e não é padronizada de mesmo modo pelos diversos laboratórios. Como os resultados são obtidos em porcentagem dos valores normais, isso muitas vezes, torna difícil a interpretação, já que para cada laboratório há uma faixa diferente de valor

de referência. Além disso, alguns centros realizam esta análise no músculo fresco (logo após a biópsia) ou no músculo congelado (- 80°C ou - 165°C) (Bernier e cols., 2002; Taylor e cols., 2004). Parece consenso, que a dosagem das enzimas da CRM, têm uma maior aplicabilidade no diagnóstico de pacientes pediátricos com manifestação clínica precoce (período neonatal até 3 anos). Nesses casos, sabe-se que a doença mitocondrial é, provavelmente, causada por um dos genes nucleares que codificam para as enzimas da CRM, e a dosagem dessas enzimas poderiam auxiliar na busca da mutação genética (Zeviani e cols., 1995; Zeviani e Carelli, 2003; Taylor e cols., 2004). No presente trabalho, embora a falta das dosagens das atividades enzimáticas da CRM possa ter comprometido a elucidação de alguns casos, ela não comprometeu o alto índice de diagnósticos, obtidos somente com a análise molecular.

#### **5.4. Características dos pacientes com e sem mutação no mtDNA**

O presente estudo comparou os achados clínicos e laboratoriais de 43 pacientes com e sem mutação no mtDNA. Os pacientes nos quais o protocolo foi eficaz em detectar alterações patogênicas no mtDNA apresentaram manifestações clínico-laboratoriais distintas para determinadas características, como por exemplo, alterações na eletroneuromiografia (padrão miopático), retinopatia pigmentar, oftalmoplegia, baixa estatura, hipotrofismo e história de acidose láctica. Algumas dessas características já haviam sido descritas por Lamont e cols. (1998), quando comparou 15 pacientes com a mutação com 162 pacientes sem a mutação. Nesse trabalho, a miopatia, a oftalmoplegia, a retinopatia pigmentar e a presença de herança materna foi significativamente maior no grupo com mutação no mtDNA (Lamont e cols., 1998).

Outro dado relevante a ser considerado, até mesmo por que se mostrou significativo no grupo de pacientes com mutação, foi a média maior da idade do início dos sintomas. Não há dúvidas, de que há uma maior chance de encontrarmos uma mutação no mtDNA em pacientes jovens ou adultos em relação aos pacientes pediátricos. A amostra desse estudo incluiu tanto pacientes adultos, como pediátricos, sem predominância de um determinado grupo. A baixa taxa de sucesso no diagnóstico molecular,

encontrada em outros estudos, pode ser decorrente de uma amostragem predominantemente pediátrica, pois se sabe que crianças com doenças mitocondriais, geralmente apresentam mutações relacionadas ao genoma nuclear (Chinnery e cols., 1999; Zeviani e Di Donato, 2004). Uma exceção à essa regra é a mutação para síndrome de Leigh (T8993C), encontrada freqüentemente do período neonatal até os 2 anos de idade e é facilmente detectável no sangue. Essa mutação pode ser encontrada com uma heteroplasmia menor em indivíduos adultos assintomáticos ou apresentando algum grau de neuropatia periférica.

Apesar de todos os esforços no sentido de delinear, com mais precisão, os critérios clínicos de maior valor diagnóstico para as doenças do mtDNA, eles ainda não estão bem estabelecidos. Jackson e cols. (1995), propuseram alguns critérios semelhantes ao que encontramos nessa amostra estudada (tabela 8), porém a maioria dos pacientes não apresentavam mutações no mtDNA e o diagnóstico foi baseado somente em critérios bioquímicos e histológicos. Todavia, acredita-se que mesmo na ausência de características altamente sugestivas, não deve ser descartada a possibilidade de doença mitocondrial.

**Tabela 8** Características clínicas das doenças mitocondriais (Jackson, 1995)

Categoria 1	Categoria 2	Categoria 3
<ul style="list-style-type: none"> <li>• oftalmoplegia*</li> <li>• acidose láctica*</li> <li>• herança materna</li> <li>• hipodesidade de putâmen</li> <li>• presença de RRF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• epilepsia mioclônica</li> <li>• ataxia</li> <li>• miopatia</li> <li>• acidente vascular cerebral após crise convulsiva</li> <li>• surdez neurosensorial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• baixa estatura*</li> <li>• déficit de crescimento</li> <li>• demência</li> <li>• regressão neurológica</li> <li>• pigmentação da retina*</li> <li>• acidose metabólica</li> <li>• atrofia óptica</li> <li>• cardiomiopatia</li> </ul>

**Categoria 1:** critério altamente sugestivo, mesmo quando presente isoladamente.

**Categoria 2:** característica que quando combinadas são sugestivas de doença da CRM. **Categoria 3:** característica comumente associada com doença da CRM mas que isoladamente, não é sugestiva desse grupo de doença. A não ser que esteja associado às características da categoria 1 (e possivelmente da categoria 2).

\* critérios encontrados no presente trabalho.

### **5.5. O emprego da variável “alta probabilidade” e “baixa probabilidade”**

No sentido de amenizar a subjetividade da impressão clínica diante de um paciente com hipótese de doença mitocondrial, alguns critérios claros foram utilizados para objetivar essa hipótese. O presente trabalho é o primeiro que “testa” o valor da impressão clínica em relação à possibilidade de se chegar ao diagnóstico molecular. Em 14 dos 17 pacientes que apresentavam uma mutação no mtDNA (82,4%), era provável a ocorrência dessa alteração. Da mesma forma, no grupo de 26 pacientes em que não foi encontrada mutação, em 17 (65,4%) a probabilidade havia previamente sido considerada baixa. Assim como no presente trabalho, recentes revisões enfatizam a necessidade de uma criteriosa avaliação clínica para estabelecer a melhor estratégia de diagnóstico (Marotta e cols., 2004; Taylor e cols., 2004). Todavia, a maioria dos trabalhos considera ainda relevante a inclusão de critérios laboratoriais, como a dosagem das enzimas da CRM, no sentido de determinar alta ou baixa probabilidade para doença mitocondrial (Bernier e cols., 2002).

Em 3 pacientes, apesar da baixa probabilidade, foi encontrada deleção no mtDNA após a biópsia muscular. Isto reforça o que já foi descrito anteriormente, sobre a extrema variabilidade clínica dessas doenças e a existência de casos atípicos, principalmente em se tratando de deleção no mtDNA. Esse dado indica ainda que doença mitocondrial deve ser cogitada diante de pacientes com doenças multissistêmicas, fenótipos atípicos e após a exaustiva exclusão de outros diagnósticos.

### **5.6. Achados histoquímicos**

No trabalho apresentado, somente 14 pacientes que apresentavam mutação no mtDNA foram submetidos ao protocolo completo de análise histoquímica (12 pacientes com deleção no mtDNA e 2 pacientes com MELAS A3243G). Foram realizadas as colorações padrão para diagnóstico de doença mitocondrial que incluiu o Gomori modificado para identificar RRF, a atividade da SDH, para identificar acúmulo subsarcolemal de mitocôndria, e a atividade da COX. Os cortes realizados, diferentemente do recomendado, não foram seriados. Essa análise permitiu a padronização dessas técnicas no músculo de pacientes com doença mitocondrial, a

ampliação da caracterização do fenótipo clínico de cada paciente e a confirmação dos achados histoquímicos já relatados na literatura. A presença de RRF foi o achado mais freqüentemente encontrado tanto nos pacientes com deleção como nos pacientes com mutação de ponto no mtDNA, o que está de acordo com a literatura (Nardin e Johns, 2001). Contudo, a representação de depósito subsarcolemal é também observada na presença de SDH hiperintensa, mas em somente 6 dos 14 pacientes foi verificado esse achado. A coloração para atividade da COX identifica o funcionamento do complexo IV da CRM e a deficiência isolada de outro complexo pode levar a uma atividade normal da COX. Muitas vezes, mas nem sempre, a presença de RRF está relacionada à atividade COX negativa. No presente trabalho, dos 12 pacientes RRF positivos, somente 8 foram COX negativos. Uma explicação para esse dado seria o fato de que os cortes não terem sido seqüenciais, o que leva à visualização de diferentes regiões das fibras musculares. A presença de fibras COX negativas em pacientes com a mutação A3243G para MELAS, encontrada nessa análise, já havia sido descrita em outros trabalhos (Jaksch e cols., 2001; Arpa e cols., 2003)

### ***5.7. O uso do PCR em tempo real para estimar a percentagem relativa de deleções no mtDNA***

No presente trabalho, a técnica de PCR em tempo real foi padronizada e aplicada com sucesso nas amostras de tecido muscular de pacientes que apresentavam deleção simples ou múltipla no mtDNA. A identificação da heteroplasmia do mtDNA permitiu estabelecer a percentagem relativa de mutação (deleção simples ou múltipla) em comparação ao fenótipo clínico apresentado. Até o presente momento, poucos trabalhos relacionaram a percentagem de deleção com a gravidade do fenótipo ou idade de início das manifestações clínicas (Chabi e cols., 2003). Apesar do número amostral ter sido restrito, o resultado desse trabalho, acena para uma necessidade de ampliar essa análise em um maior número de pacientes. Até pouco tempo atrás, a quantificação de deleção no mtDNA era realizada através da metodologia convencional

(*Southern blot* pelo método radioativo). Contudo, trabalhos recentes têm demonstrado as vantagens do uso do PCR em tempo real tanto na quantificação quanto no diagnóstico das deleções no mtDNA (He e cols., 2002; Chabi e cols., 2003). A determinação da percentagem relativa de mtDNA deletado pode ser realizada tanto por *Southern Blot* quanto pelo PCR em tempo real. Porém, quando é necessário o estabelecimento do diagnóstico de deleção no mtDNA, ainda há a necessidade da metodologia tradicional, tendo em vista as dificuldades na interpretação de pacientes com de deleções múltiplas (Chabi e cols., 2003). No presente trabalho, as duas técnicas mostraram-se complementares, inclusive confirmando o achado de deleção múltipla no paciente investigado.

A ausência de correlação entre os diferentes fenótipos (KSS, PEO, síndrome de Pearson e encefalomiopatia mitocondrial) e a percentagem relativa de mtDNA deletado no tecido muscular podem estar relacionadas ao baixo número amostral, ou pode ser que essa associação não exista, sendo necessários trabalhos adicionais para esclarecer esse dado.

### **5.8. Achados de neuroimagem**

O estudo de neuroimagem através da TCC e/ou RNM de crânio foi realizado em todos os pacientes investigados, porém a RNM com espectroscopia por emissão de prótons foi possível em apenas três pacientes. As dificuldades encontradas foram o elevado custo do exame e impedimentos próprio de alguns pacientes como, por exemplo, uso de marca-passo cardíaco e o deslocamento até outro local para a realização do exame. A RNM com espectroscopia permitiu a avaliação dos seguintes compostos químicos cerebrais: N-acetilaspártato, creatina, colina e lactato. Os achados obtidos nos três pacientes com deleção no mtDNA e quadro clínico não clássico mostraram, em todos, sinais de lesões cerebrais difusas e presença de um pico invertido de lactato. Essas alterações já haviam sido descritas por outros autores, porém sempre em paciente com fenótipo mitocondrial clássico (Kapeller e cols., 1996; Chu e cols., 1999; Bianchi e cols., 2003). Não obstante, no presente relato, os achados descritos para cada paciente, mostravam características distintas e particulares, caracterizando ainda mais a multiplicidade das manifestações clínicas, e



nesse momento, manifestações neuroradiológicas. Apesar do pequeno número de pacientes, foi possível estabelecer que a realização da RNM com espectroscopia poderá ser útil em definir a condução da investigação clínica e laboratorial de pacientes com suspeita de mitocondriopatia.

# **Capítulo VI**

## **6- CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

**Objetivo 1:** Desenvolver e aplicar um protocolo de investigação clínica e laboratorial em um grupo de pacientes com alto risco de apresentar uma doença mitocondrial;

### **Conclusões:**

- A aplicação do protocolo clínico-laboratorial permitiu o diagnóstico de 17 (39,5%) pacientes com doenças mitocondriais.
- A taxa de diagnóstico obtida com a aplicação do protocolo foi superior à encontrada em trabalhos já publicados.
- A frequência das mutações encontradas foi semelhante à observada em outros trabalhos.
- Não pode se excluída a possibilidade de doença mitocondrial nos pacientes nos quais foi negativo a pesquisa das mutações.
- O fenótipo clínico apresentado pelos pacientes foi significativamente heterogêneo e nem todos apresentaram manifestação de síndrome clássica.

**Objetivo 2:** Comparar os achados clínicos e laboratoriais em pacientes com e sem mutação identificada no mtDNA estabelecendo os critérios clínicos e laboratoriais que conferem maior risco para a presença de uma doença mitocondrial;

### **Conclusões:**

- A comparação permitiu definir que fatores preditivos para doença relacionada ao DNA mitocondrial são os seguintes: eletroneuromiografia com padrão miopático, presença de retinopatia pigmentar, oftalmoplegia e ptose palpebral, baixa estatura, hipotrofismo e acidose láctica.
- Há uma menor chance de detecção de mutação no mtDNA em pacientes mais jovens.

- A idade de início dos sintomas é significativamente maior em indivíduos com mutação no mtDNA.
- Não houve diferença entre a média de lactato em jejum e a média de lactato pós-prandial ou a diferença entre os dois valores, tanto em pacientes com mutação como em pacientes sem mutação no mtDNA.
- As crises convulsivas, bem como alterações no eletroencefalograma foram mais freqüentes nos pacientes sem mutação detectada no mtDNA

**Objetivo 3:** Empregar a variável “alta probabilidade” e “baixa probabilidade” em pacientes com suspeita clínica de doença mitocondrial, correlacionando-a com os resultados do protocolo molecular;

**Conclusões:**

- Os critérios clínicos para caracterizar a variável “alta probabilidade” e “baixa probabilidade” contribuíram para a predição do resultado dos pacientes com e sem mutação no mtDNA.
- Em 14 dos 17 pacientes que apresentaram uma mutação no mtDNA (82,4%), a probabilidade da ocorrência dessa alteração havia sido considerada alta.

**Objetivo 4:** Testar um protocolo de análise histoquímica de tecido muscular em todos os casos de suspeita de doença mitocondrial submetidos à biópsia de músculo;

**Conclusão:**

- O protocolo histoquímico completo para doenças mitocôndrias foi testado em todos os pacientes submetidos à biópsia muscular; contudo, por dificuldades inerentes da técnica, somente os resultados dos pacientes com deleção no mtDNA foram descritos.

- A presença de RRF foi o achado mais freqüentemente encontrado tanto nos pacientes com deleção como nos pacientes com mutação de ponto no mtDNA.

**Objetivo 5:** Desenvolver um protocolo não radioativo para detectar deleções no mtDNA em pacientes com suspeita de doença mitocondrial;

**Conclusões:**

- O protocolo de *Southern blot* não radioativo foi padronizado e aplicado com sucesso em todas as amostras de DNA extraído de tecido muscular.
- A padronização desse protocolo permitiu o diagnóstico dos 12 pacientes com deleção no mtDNA.
- O protocolo não permitiu a quantificação da deleção no mtDNA

**Objetivo 6:** Detectar e quantificar as deleções no mtDNA na amostra estudada através da técnica de PCR em tempo real correlacionando com o fenótipo clínico;

**Conclusão:**

- A análise por PCR em tempo real em amostras de mtDNA extraído de tecido muscular, permitiu a quantificação relativa da deleção no mtDNA em 11 pacientes.
- A técnica de PCR em tempo real, quando utilizado para quantificação da deleção no mtDNA, mais prática e rápida quando comparada com a técnica de *Southern blot*.
- Essa técnica mostrou-se reprodutível e de alta sensibilidade na quantificação de deleção no mtDNA, entretanto, ainda deve ser utilizada associada ao *Southern blot* para definição do diagnóstico.
- Não houve correlação entre a percentagem relativa de deleção no mtDNA com o fenótipo clínico ou idade de início das manifestações clínicas.

**Objetivo 7:** Descrever os achados de RNM com espectroscopia por emissão de prótons em pacientes com deleção no mtDNA e fenótipo clínico atípico.

**Conclusão:**

- A RNM com espectroscopia demonstrou que, apesar da variabilidade clínica, todos os pacientes apresentavam lesões cerebrais difusas e presença de um pico invertido de lactato.
- A utilização desse exame pode ser importante na condução da investigação de um paciente com suspeita clínica de doença mitocondrial.

## **Capítulo VII**

### **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-65.

Arpa J, Cruz-Martinez A, Campos Y, Gutierrez-Molina M, Garcia-Rio F, Perez-Conde C, Martin MA, Rubio JC, Del Hoyo P, Arpa-Fernandez A, Arenas J (2003). Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients. *Muscle Nerve* 28: 690-5.

Barshop BA, Naviaux RK, McGowan KA, Levine F, Nyhan WL, Loupis-Geller A, Haas RH (2004). Chronic treatment of mitochondrial disease patients with dichloroacetate. *Mol Genet Metab* 83: 138-49.

Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR (2002). Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 59: 1406-11.

Bianchi MC, Tosetti M, Battini R, Manca ML, Mancuso M, Cioni G, Canapicchi R, Siciliano G (2003). Proton MR spectroscopy of mitochondrial diseases: analysis of brain metabolic abnormalities and their possible diagnostic relevance. *AJNR Am J Neuroradiol* 24: 1958-66.

Burgeois M, Goutieres F, Chretien D, Rustin P, Munnich A, Aicardi J (1992). Deficiency in complex II of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome. *Brain Dev* 14: 404-8.

Chabi B, Mousson de Camaret B, Duborjal H, Issartel JP, Stepien G (2003). Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: application to diagnosis. *Clin Chem* 49: 1309-17.

Chinnery PF (2004). New approaches to the treatment of mitochondrial disorders. *Reprod Biomed Online* 8: 16-23.

Chinnery PF, Howell N, Andrews RM, Turnbull DM (1999). Clinical mitochondrial genetics. *J Med Genet* 36: 425-36.

Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM (1997). Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* 120 (Pt 10): 1713-21.

Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM (1998). Genetic counseling and prenatal diagnosis for mtDNA disease. *Am J Hum Genet* 63: 1908-11.

Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Taylor RW, Bindoff LA, Turnbull DM (2000). The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 48: 188-93.



# ANEXO I

## PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE DOENÇA MITOCONDRIAL:

1. Nome: Número no projeto:  
2. Data de nascimento: idade:  
3. Reg Hospitalar: Reg SGM: Reg EIM:  
4. Data da consulta:  
5. Origem étnica:  
    5.1- materna-  
    5.2- paterna-  
6. Heredograma:

7. Evolução da doença atual (**manifestação inicial e seguimento**):

8. Critérios para a suspeita diagnóstica:

<b>MAIORES:</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Idade de aparecimento</b>
- acidose láctica persistente			
- miopatia (hipotonia, fraqueza)			
- convulsões			
- retardo psicomotor			
- déficit de crescimento, baixa estatura			
<b>MENORES:</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Idade de aparecimento</b>
- epilepsia mioclônica			
- oftalmoplegia, alterações oculomotoras			
- atrofia óptica			
- degeneração pigmentar da retina			
- cardiomiopatia hipertrófica			
- ataxia cerebelar			
- surdez neurossensorial			
- arritmia cardíaca			
- <i>diabete mellitus</i>			
- AVC			
- episódios da apnéia ou taquipnéia			
- disfunção tubular renal			
- alterações de provas de função hepática			
- pancitopenia, aplasia de medula			

9. Outras manifestações neurológicas:  
9.1- tipo de crise convulsiva:  
9.2- tipo de movimentação ocular anormal:  
9.3- disartria:

- 9.4- disfagia:
- 9.5- marcha:
- 9.6- tremor:
- 9.7- dor muscular, caimbras:
- 9.8- fasciculações:
- 9.9- sinais extrapiramidais:
- 9.10- movimentos involuntários:
- 9.11- distúrbios psiquiátricos, comportamentais:

- 10. Outras manifestações:
- 11. Uso de medicações:
- 12. Tabagismo:
- 13. Uso de álcool:

**14. Exame físico:**

- 14.1- peso:
- 14.2- estatura:
- 14.3- PC:
- 14.4- Fenótipo:
- 14.5- Av respiratória:
- 14.6- Av cardiovascular:
- 14.7- Av gastrointestinal:
- 14.8- Av neurológica:
  - cognitivo (dia / mês/ ano/ dia da semana/ estação do ano/ local/ cidade/ estado/ país):
  - marcha:
  - coordenação:
  - força:
  - tônus:
  - reflexos superiores:
  - reflexos inferiores:
  - pares crânicos:
  - propriocepção:
  - sensibilidade vibratória:
  - sensibilidade tátil:

**15. Exames:**

- 15.1- TC (data, local):
- 15.2- RNM (data, local):
- 15.3- ENMG (data, local):
- 15.4- EEG (data):
- 15.5- ECG (data)/ Ecocardio com dopler:
- 15.6- bioquímica:
  - EIM:
    - Lactato basal:
    - Glicemia:
    - Gasometria:
    - CG ácidos orgânicos:
    - Rel L/P:
    - Lactato no líquido:
    - Teste de sobrecarga de glicose – 2g/Kg (max 50g):

<b>Tempo</b>	<b>Glicemia</b>	<b>Lactato</b>
0 min		
60 min		

15.7- Biópsia muscular:

	<b>Presença</b>	<b>Ausência</b>	<b>observações</b>
Alterações na morfologia			
RRF			
SDH (desidrogenase succinica)			
Citocromo c oxidase			
ATPase			
NADH			

15.8- análise de DNA:

<b>Mutação</b>	<b>Presença</b>	<b>Ausência</b>	<b>observações</b>
A3243G (MELAS, tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>			
T3271C (MELAS, tRNA <sup>Leu(UUR)</sup> );			
A8344G (MERRF, tRNA <sup>Lys</sup> );			
T8356C (MERRF, , tRNA <sup>Lys</sup> );			
T8993G (NARP/Leigh, ATPase 6).			
Mutações adicionais			

**Avaliação de envolvimento de sistemas:**

<b>SISTEMA</b>	<b>SIM</b>	<b>NÃO</b>	<b>NÃO INVESTIGADO</b>
<input type="checkbox"/> FIGADO: Disfunção hepatocelular Icterícia			
<input type="checkbox"/> RIM: Tubulopatia proximal Tubulopatia distal Proteinúria Litíase Falência renal			
<input type="checkbox"/> CORAÇÃO: Cardiomiopatia hipertrófica Bloqueio cardíaco (Eco, ECG)			
<input type="checkbox"/> MÚSCULO: Miopatia RRF Anormalidade histológica CK, LDH alterada			
<input type="checkbox"/> CÉREBRO: Leucodistrofia Polidistrofia Hipodensidade cérebro Hipodensidade cerebelo Hipodensidade nucleos da base Sinal multifocal hiperintenso (MELAS) Lesão simétrica em N.B. e ganglios da base (LEIGH)			
<input type="checkbox"/> NERVOS PERIFÉRICOS: Perda sensorial distal Hipo/arreflexia Fraqueza muscular distal Diminuição velocidade de condução nervo motor Desnervação (degeneração axonal, desmielinização)			
<input type="checkbox"/> PANCREAS: Disfunção do pâncreas exócrino			
<input type="checkbox"/> INTESTINO: Atrofia de vilus			
<input type="checkbox"/> ENDÓCRINO :			

	Hipocalcemia			
	Hipoparatiroidismo			
<input type="checkbox"/>	MEDULA ÓSSEA:	Anemia		
		Neutropenia		
		Trombocitopenia		
		Pencitopenia		
<input type="checkbox"/>	OLHOS	Oftalmoplegia externa progressiva		
		Ptose		
		Atrofia óptica		
		Degeneração retiniana (FO, ERG, PEV)		
<input type="checkbox"/>	OUVIDO:	Surdez neurosensorial (PEA)		
<input type="checkbox"/>	PELE	Tricodistrofia		
		Moteamento em áreas expostas ao sol		

Chinnery PF, Samuels DC, Elson J, Turnbull DM (2002). Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? *Lancet* 360: 1323-5.

Chinnery PF, Schon EA (2003). Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1188-99.

Chinnery PF, Turnbull DM (1999). Mitochondrial DNA and disease. *Lancet* 354 Suppl 1: S117-21.

Chinnery PF, Turnbull DM (2000). Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today* 6: 425-32.

Chu BC, Terae S, Takahashi C, Kikuchi Y, Miyasaka K, Abe S, Minowa K, Sawamura T (1999). MRI of the brain in the Kearns-Sayre syndrome: report of four cases and a review. *Neuroradiology* 41: 759-64.

Dahl HH, Thorburn DR (2001). Mitochondrial diseases: beyond the magic circle. *Am J Med Genet* 106: 1-3.

De Sanctis V, Calzolari F, Piazzini A, Berio A (2003). Kearns-Sayre syndrome associated with growth hormone deficiency. *Pediatr Med Chir* 25: 447-51.

De Vivo DC (1993). The expanding clinical spectrum of mitochondrial diseases. *Brain Dev* 15: 1-22.

DiMauro S (2001). Lessons from mitochondrial DNA mutations. *Semin Cell Dev Biol* 12: 397-405.

Dimauro S, Mancuso M, Naini A (2004). Mitochondrial encephalomyopathies: therapeutic approach. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 232-45.

DiMauro S, Schon EA (2001). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 106: 18-26.

DiMauro S, Schon EA (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348: 2656-68.

Dimauro S, Tay S, Mancuso M (2004). Mitochondrial encephalomyopathies: diagnostic approach. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 217-31.

Ernster L (1984). Mechanism and regulation of mitochondrial ATP synthesis. *Curr Top Cell Regul* 24: 313-34.

Ernster L, Ikkos D, Luft R (1959). Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* 184: 1851-4.

Finsterer J (2004). Mitochondriopathies. *Eur J Neurol* 11: 163-86.

Folgero T, Torbergesen T, Oian P (1995). The 3243 MELAS mutation in a pedigree with MERRF. *Eur Neurol* 35: 168-71.

Goto Y (1993). MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy lactic acidosis, and stroke-like episodes): clinical features and mitochondrial DNA mutations. *Nippon Rinsho* 51: 2373-8.

Goto Y (1995). Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve* 3: S107-12.

Goto Y (2001). Clinical and molecular studies of mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis* 24: 181-8.

Goto Y, Koga Y, Horai S, Nonaka I (1990). Chronic progressive external ophthalmoplegia: a correlative study of mitochondrial DNA deletions and their phenotypic expression in muscle biopsies. *J Neurol Sci* 100: 63-9.

Goto Y, Nonaka I, Horai S (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348: 651-3.

Goto Y, Nonaka I, Horai S (1991). A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta* 1097: 238-40.

Hammans SR, Sweeney MG, Hanna MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE (1995). The mitochondrial DNA transfer RNA<sup>Leu</sup>(UUR) A->G(3243) mutation. A clinical and genetic study. *Brain* 118 (Pt 3): 721-34.

He L, Chinnery PF, Durham SE, Blakely EL, Wardell TM, Borthwick GM, Taylor RW, Turnbull DM (2002). Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e68.

Holt IJ, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Harding AE (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet* 1: 1462.

Holt IJ, Miller DH, Harding AE (1988). Restriction endonuclease analysis of leukocyte mitochondrial DNA in Leber's optic atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 1075-7.

Houshmand M, Gardner A, Hallstrom T, Muntzing K, Oldfors A, Holme E (2004). Different tissue distribution of a mitochondrial DNA duplication and the corresponding deletion in a patient with a mild mitochondrial encephalomyopathy: deletion in muscle, duplication in blood. *Neuromuscul Disord* 14: 195-201.

Jaksch M, Kleinle S, Scharfe C, Klopstock T, Pongratz D, Muller-Hocker J, Gerbitz KD, Liechti-Gallati S, Lochmuller H, Horvath R (2001). Frequency of mitochondrial transfer RNA mutations and deletions in 225 patients presenting with respiratory chain deficiencies. *J Med Genet* 38: 665-73.

Kapeller P, Fazekas F, Offenbacher H, Stollberger R, Schmidt R, Bergloff J, Radner H, Fazekas G, Schafhalter-Zoppoth I (1996). Magnetic resonance imaging and spectroscopy of progressive cerebral involvement in Kearns Sayre Syndrome. *J Neurol Sci* 135: 126-30.

Kearns TP, Sayre GP (1958). Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch Ophthalmol* 60: 280-9.

Kwon SJ, Park SS, Kim JM, Ahn TB, Kim SH, Kim J, Lee SH, Ha CK, Ahn MY, Jeon BS (2004). Investigation of common mitochondrial point mutations in Korea. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 339-44.

Lamont PJ, Surtees R, Woodward CE, Leonard JV, Wood NW, Harding AE (1998). Clinical and laboratory findings in referrals for mitochondrial DNA analysis. *Arch Dis Child* 79: 22-7.

Leonard JV, Schapira AH (2000). Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 355: 299-304.

Leonard JV, Schapira AH (2000). Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* 355: 389-94.

Liang MH, Wong LJ (1998). Yield of mtDNA mutation analysis in 2,000 patients. *Am J Med Genet* 77: 395-400.

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41: 1776-804.

Marotta R, Chin J, Quigley A, Katsabanis S, Kapsa R, Byrne E, Collins S (2004). Diagnostic screening of mitochondrial DNA mutations in Australian adults 1990-2001. *Intern Med J* 34: 10-9.

McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM (2002). The neurology of mitochondrial DNA disease. *Lancet Neurol* 1: 343-51.

Moraes CT, Ricci E, Petruzzella V, Shanske S, DiMauro S, Schon EA, Bonilla E (1992). Molecular analysis of the muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nat Genet* 1: 359-67.

Morgan-Hughes JA (1994). Mitochondrial diseases of muscle. *Curr Opin Neurol* 7: 457-62.

Munnich A, Rotig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP, Saudubray JM, Rustin P (1996). Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inherit Metab Dis* 19: 521-7.



Munnich A, Rustin P (2001). Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 106: 4-17.

Nardin RA, Johns DR (2001). Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 24: 170-91.

Park SB, Ma KT, Kook KH, Lee SY (2004). Kearns-Sayre syndrome -3 case reports and review of clinical feature. *Yonsei Med J* 45: 727-35.

Romero NB, Lombes A, Touati G, Rigal O, Frachon P, Cheval MA, Giraud M, Possekel S, Fardeau M, Ogier de Baulny H (1996). Morphological studies of skeletal muscle in lactic acidosis. *J Inherit Metab Dis* 19: 528-34.

Schapira AH (1998). Inborn and induced defects of mitochondria. *Arch Neurol* 55: 1293-6.

Schapira AH, Cock HR (1999). Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Eur J Clin Invest* 29: 886-98.

Schinogil P, Muller M, Steinborn R (2001). Quantification of the 4977-bp deletion in human mitochondrial DNA using real-time PCR. *Forensic Sci Int* 122: 197-9.

Schwartz M, Vissing J (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347: 576-80.

Shoffner J, Wallace D (1990). *Oxidative phosphorylation diseases disorders of two genomes*. New York, Plenum Press.

Shoffner JM (1999). Oxidative phosphorylation disease diagnosis. *Semin Neurol* 19: 341-51.

Shoffner JM, Fernhoff PM, Krawiecki NS, Caplan DB, Holt PJ, Koontz DA, Takei Y, Newman NJ, Ortiz RG, Polak M (1992). Subacute necrotizing encephalopathy: oxidative phosphorylation defects and the ATPase 6 point mutation. *Neurology* 42: 2168-74.

Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, DiMauro S (1992). A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 51: 1213-7.

Skladal D, Sudmeier C, Konstantopoulou V, Stockler-Ipsiroglu S, Plecko-Startinig B, Bernert G, Zeman J, Sperl W (2003). The clinical spectrum of mitochondrial disease in 75 pediatric patients. *Clin Pediatr (Phila)* 42: 703-10.

Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2: 342-52.

Sparaco M, Bonilla E, DiMauro S, Powers JM (1993). Neuropathology of mitochondrial encephalomyopathies due to mitochondrial DNA defects. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 1-10.

Stacpoole PW, Nagaraja NV, Hutson AD (2003). Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol* 43: 683-91.

Taylor RW, Chinnery PF, Clark KM, Lightowlers RN, Turnbull DM (1997). Treatment of mitochondrial disease. *J Bioenerg Biomembr* 29: 195-205.

Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull DM (2004). The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul Disord* 14: 237-45.

Thorburn DR (2004). Mitochondrial diseases: not so rare after all. *Intern Med J* 34: 3-5.

Thorburn DR (2004). Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *J Inherit Metab Dis* 27: 349-62.

Tiranti V, Munaro M, Sandona D, Lamantea E, Rimoldi M, DiDonato S, Bisson R, Zeviani M (1995). Nuclear DNA origin of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome: genetic evidence based on patient's-derived rho degrees transformants. *Hum Mol Genet* 4: 2017-23.

Tulinius MH, Holme E, Kristiansson B, Larsson NG, Oldfors A (1991). Mitochondrial encephalomyopathies in childhood. I. Biochemical and morphologic investigations. *J Pediatr* 119: 242-50.

Tulinius MH, Holme E, Kristiansson B, Larsson NG, Oldfors A (1991). Mitochondrial encephalomyopathies in childhood. II. Clinical manifestations and syndromes. *J Pediatr* 119: 251-9.

Vilarinho L, Santorelli FM, Coelho I, Rodrigues L, Maia M, Barata I, Cabral P, Dionisio A, Costa A, Guimaraes A, DiMauro S (1999). The mitochondrial DNA A3243G mutation in Portugal: clinical and molecular studies in 5 families. *J Neurol Sci* 163: 168-74.

Walker UA, Collins S, Byrne E (1996). Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur Neurol* 36: 260-7.

Wallace DC (1997). Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci Am* 277: 40-7.

Wallace DC (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-8.

Wallace DC (2001). Mitochondrial defects in neurodegenerative disease. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7: 158-66.

Wallace DC, Brown MD, Lott MT (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238: 211-30.

---

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, 2nd, Nikoskelainen EK (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427-30.

Wallace DC, Zheng XX, Lott MT, Shoffner JM, Hodge JA, Kelley RI, Epstein CM, Hopkins LC (1988). Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55: 601-10.

Warner TT, Schapira AH (1997). Genetic counselling in mitochondrial diseases. *Curr Opin Neurol* 10: 408-12.

Williams RS (2002). Another surprise from the mitochondrial genome. *N Engl J Med* 347: 609-12.

Wolf NI, Smeitink JA (2002). Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology* 59: 1402-5.

Wong LJ, Liang MH, Kwon H, Park J, Bai RK, Tan DJ (2002). Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. *Clin Chem* 48: 1901-12.

Zeviani M, Amati P, Comi G, Fratta G, Mariotti C, Tiranti V (1995). Searching for genes affecting the structural integrity of the mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta* 1271: 153-8.

Zeviani M, Antozzi C (1992). Defects of mitochondrial DNA. *Brain Pathol* 2: 121-32.

Zeviani M, Bertagnolio B, Uziel G (1996). Neurological presentations of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis* 19: 504-20.

Zeviani M, Carelli V (2003). Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 16: 585-94.

Zeviani M, Di Donato S (2004). Mitochondrial disorders. *Brain* 127: 2153-72.

## **ANEXOS**

---

## **ANEXO II**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

**Projeto de Pesquisa: “DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS: UMA ABORDAGEM INTEGRADA AOS ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS”**

**Investigador responsável: Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira**

#### **OBJETIVO DA PESQUISA:**

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

#### **PROCEDIMENTO:**

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para confirmar meu estado clínico. Além disso, poderei ser submetido a exames subsidiários laboratoriais (coleta de sangue), de imagem (como tomografia computadorizada ou a uma ressonância magnética de crânio), eletroneuromiografia e biópsia muscular. Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 a 20 ml),. Os exames mencionados acima, fazem parte dos procedimentos médicos de rotina para um paciente com doença mitocondrial. Os procedimentos mencionados acima serão realizados dentro do primeiro ano após o meu consentimento em participar no estudo, porém a pesquisa laboratorial utilizando as amostras de sangue poderá ser feita durante um período de até 30 anos após a coleta.

**Projeto de Pesquisa: “DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS: UMA ABORDAGEM INTEGRADA AOS ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS”**

**RISCO E DESCONFORTO:**

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

**Biópsia muscular:** A biópsia muscular é um procedimento simples, porém, para maior segurança, deve ser realizada em ambiente cirúrgico, podendo ser feita em pacientes de qualquer idade. Antes deste procedimento, solicita-se exames para avaliar a coagulação do sangue (TP, KKTTP), anemia (hemograma) e avaliação cardíaca (ECG). Não é necessário o jejum antes do exame. Seleciona-se o local a ser biopsiado, geralmente coxa ou braço, esteriliza-se (limpeza) do local com iodofor alcoólico ou aquoso, faz-se uma anestesia abaixo da pele usando a Lidocaína a 2% com vasoconstritor. O músculo não será anestesiado, pois inviabiliza os estudos posteriores. Faz-se uma abertura da pele (cerca de 3cm de comprimento) até chegar-se ao músculo. No momento da retirada do mesmo haverá desconforto, tolerável, devido a falta de anestesia pelo motivo acima exposto. Retiram-se cerca de 03-04 fragmentos (pedacinhos) com cerca de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm. Procede-se o fechamento com pontos internos (absorvíveis - não sendo necessários retirá-los pois desaparecerão com o tempo) e pontos externos (inabsorvíveis), retirados posteriormente. Faz-se curativo com gaze estéril e micropore, sendo entregue orientação quanto ao curativo, bem como receita de medicamento em caso de desconforto (dor). Os pontos são retirados em 07-10 dias, estando o médico a disposição do paciente para qualquer eventualidade decorrente desse procedimento.

**VANTAGENS:**

Eu entendo com a minha participação nesse estudo, o meu diagnóstico será mais preciso e claro, apesar disto, o meu tratamento provavelmente não será modificado. Os resultados dos testes moleculares obtidos, serão disponíveis através do meu acompanhamento no ambulatório do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, tel. (51) 21018011, 81210058.

**SIGILO:**

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, farão parte do meu prontuário médico.

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

**RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os

**Projeto de Pesquisa: "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS: UMA ABORDAGEM INTEGRADA AOS ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS"**

cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HCPA. Eu reconheço também que a Dra. Carolina Fischinger Moura de Souza pode interromper a minha participação nesse estudo a qualquer momento que julgar apropriado. Eu confirmo que o (a) Dr(a)

---

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

---

Nome do participante ou responsável

---

Assinatura do participante ou responsável

---

data

**RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:**

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

---

Nome do pesquisador

---

Assinatura do pesquisador

---

data

## ANEXO III

### PROTÓCOLOS DE ANÁLISE MOLECULAR

#### 1. PCR/RFLP

A amplificação pela PCR da região de interesse foi realizada através de protocolos padrão e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados em cada caso encontram-se descritos abaixo. A detecção da mutação foi realizada por RFLP, utilizando endonucleases de restrição específicas, as quais encontram-se a seguir, assim como a interpretação dos resultados finais.

**Mutação:** T8993G

**Primers:**

**8851 F** – 5' CCT AGC CAT GGC CAT CCC CGT ATG 3'

**8851 B** – 5' GGC TGA GAG GGC CCC TGT TAG G 3'

**Endonuclease de restrição:** *MspI*

**Interpretação dos resultados:**

Padrão normal: 449 pb

Padrão mutante: 164 pb e 285 pb

---

**Mutação:** T8356C

**Primers:**

**8356 F** – 5'CTT TGA AAT AGG GCC CGT ATT TAC C 3' (Apa 8249-F)

**8356 B** – 5'ATT TAG TTG GGG CAT TTC ACT TTA 3' (MERRF 8356 B)

**Endonuclease de restrição:** *DraI*

**Interpretação dos resultados:**

Padrão normal: 119 pb e 22 pb

Padrão mutante: 141 pb

---

**Mutação:** A8344G

**Primers:**

**8344 F** – 5' CTA CCC CCT CTA GAG CCC AC 3' (MERRF 8344 F)

**8344 B** – 5' GTA GTA TTT AGT TGG GGC ATT TCA CTG TAA AGC CGT GTT GG 3' (MERRF 8344 B)



**Endonuclease de restrição:** *BglI*

**Interpretação dos resultados:**

Padrão normal: 108 pb

Padrão mutante: 108 pb, 73 pb e 35 pb

---

**Mutação:** A3243G

**Primers:**

**3243 F** – 5' CCT CCC TGT ACC AAA GGA C 3' (Rsa 3123F)

**3243 B** – 5'GCG ATT AGA ATG GGG TAC AAT G 3' (Rsa 3337B)

**Endonuclease de restrição:** *HaeIII*

**Interpretação dos resultados:**

Padrão normal: 169 pb, 37 pb e 32 pb

Padrão mutante: 169 pb, 97 pb, 72 pb, 37 pb e 32 pb

---

**Mutação:** MELAS A3271T

**Primers:**

5' CCC ATA GTA GGC CTA AAA GCA GCC 3' (**stu 2172-F**)

5' GAG GAA TTG AAC CTC TGA CTC TAA 3' (**MELAS 3295-B**)

**Endonuclease de restrição:** *DdeI*

**Interpretação dos resultados:**

Padrão normal: 692 pb, 210 pb, 126 pb e 103 pb

Padrão mutante: 692 pb, 210 pb, 126 pb, 103 pb, 79 pb e 24 pb

## 2. Seqüenciamento do tRNA de Lisina

- A reação de amplificação por PCR da região de interesse foi realizada utilizando os seguintes oligonucleotídeos:  
**8356F** (5' CGG TCA ATG CTC TGA AAT CTG 3') e  
**8407B** (5' GGG TGA TGA GGA ATA GTG TAA G 3') (Mitomap).
- A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando o Kit QIAquick<sup>®</sup> (Qiagen) visando principalmente a remoção dos dNTPs não incorporados e do excesso de enzima.
- Reação de seqüenciamento: os produtos de PCR foram seqüenciados utilizando o kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), o qual inclui todos os reagentes para a reação, inclusive os ddNTPs marcados com corantes fluorescentes. O seqüenciamento foi realizado nos dois sentidos (*forward* e *reverse*) a partir dos mesmos oligonucleotídeos iniciadores usados na reação de PCR (8356F e 8407B). Após a reação de seqüenciamento, os produtos foram analisados por eletroforese capilar em um Analisador Genético modelo ABI PRISM<sup>®</sup> 310 (Applied Biosystems), utilizando os softwares GeneScan<sup>®</sup> versão 3.1 e Genotyper<sup>®</sup> software versão 2.5 para interpretação dos resultados.

## 3. Seqüenciamento do tRNA de Leucina

- O seqüenciamento do tRNA de leucina foi realizado da mesma forma descrita acima, exceto pela utilização dos seguintes oligonucleotídeos:  
**3243F** (5' CCT CCC TGT ACC AAA GGA C 3') e  
**3243B** (5' GCG ATT AGA ATG GGG TAC AAT G 3') (Mitomap)

#### **4. Detecção das deleções no mtDNA (Adaptado de Moraes, 1992)**

O DNA foi digerido com a endonuclease de restrição *PvuII* e aplicado em gel de agarose 0,8% (p/v). Após a eletroforese, os fragmentos foram transferidos por capilaridade para a membrana de nylon (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>), utilizando para isto uma solução de cloreto de sódio 3M - citrato de sódio 0,3M (SSC 20X). O DNA foi fixado à membrana através da exposição à luz ultravioleta durante 4 minutos.

A marcação da sonda e a detecção do mtDNA foi realizada com o kit ECL<sup>TM</sup> 3'- oligolabelling and detection system (Amersham). O protocolo empregado foi baseado nas instruções fornecidas pelo fabricante, com algumas adaptações.

## 5. Quantificação da deleção no mtDNA por PCR em tempo real (RT-PCR) em tecido muscular (Adaptado de He e cols., 2002).

A reação de PCR foi realizada pelo método PCR quantitativo em tempo real, utilizando-se o ABI 7500 Real Time PCR System. Neste protocolo, o sistema TaqMan<sup>®</sup> foi utilizado, o qual utiliza sondas marcadas com composto fluorescente. As sondas correspondem a regiões bem distintas no mtDNA, sendo que uma delas abrange a região do gene ND1 e a outra do gene ND4 (Figura 1).

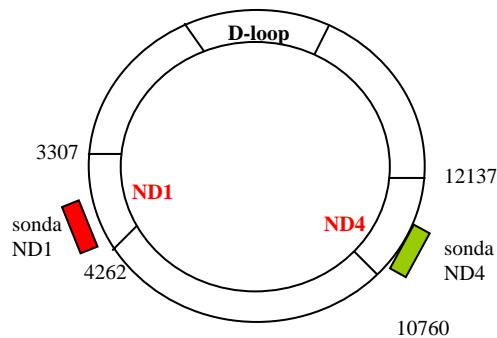


Figura 1– Representação esquemática do mtDNA: localização da deleção e das sondas ND1 e ND4

A região do gene ND1 é caracterizada pela baixa freqüência de ocorrência de deleções, isto é, está íntegra em 94% dos casos de deleção simples, e em 100% dos casos com deleções múltiplas. Por outro lado, a região do gene ND4 está deletada em cerca de 82% dos casos de deleção simples e em 96% dos casos de deleções múltiplas (He e cols., 2002). Para amplificação da região ND1, os *primers* L3485-3504 (sentido senso) e H3532-3553 (anti-senso) e a sonda L3506-3529 foram utilizados. E, para amplificação da região ND4, os *primers* L12087-12109 (senso) e H12140-12170 (anti-senso) e a sonda L12111-12138 foram utilizados.

A técnica de quantificação fornece valores de ciclos de limiar de detecção (Ct – *threshold cycle*), que significa o número de ciclos em que a fluorescência ultrapassa um limite de detecção fixo, para as respectivas regiões

ND1 e ND4. A partir desses valores, pode ser calculado o chamado delta Ct ( $\Delta Ct = Ct_{ND1} - Ct_{ND4}$ ), que determina matematicamente a diferença relativa no nível de ácidos nucléicos (no nosso caso, mtDNA) de diferentes amostras ou diferentes regiões gênicas (Walker, 2002). Nesse caso, o  $\Delta Ct$  indica o percentual de deleção na região do gene de ND4.