

**Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre**

**Disciplina de Genética Básica**

**Doenças Mitocondriais - uma Revisão sobre MERRF**

**Lucas Spanemberg**

**Manuela Meinhardt Peixoto**

**Marianne de Aguiar Possa**

**Ramiro Ronchetti**

**Niara Bichara de Oliveira**

**Porto Alegre, 25 de outubro de 2001.**

## 1. Introdução

A Epilepsia Mioclônica com Fibras Rotas Vermelhas (MERRF) é uma doença mitocondrial que junto com as outras citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças de expressão clínica heterogênea decorrentes de alterações do metabolismo energético celular <sup>(1)</sup>. Epilepsia mioclônica são convulsões periódicas incomuns inicialmente focais, progredindo a contrações musculares generalizadas e cíclicas<sup>(2)</sup>. Ao eletroencefalograma mostra descargas de polipontas-ondas, sobretudo na região occipital, com alentecimento progressivo e um ritmo de fundo desorganizado. A formação de fibras vermelhas rotas resulta da proliferação mitocondrial, que ocorre em MERRF, e parece ser desencadeada por um desequilíbrio entre a necessidade de energia e a eficiência da oxidação/fosforilação da fibra muscular <sup>(3)</sup>.

A mitocôndria, organela responsável pela produção de energia armazenada em trifosfato de adenosina (ATP), através do processo de fosforilação oxidativa, possui DNA próprio (DNAm), que apresenta características próprias <sup>(1, 3, 4, 5, 6, 7, 8)</sup> que serão desenvolvidas ao longo do trabalho. As mutações do DNAm podem causar falhas no processo de obtenção de energia nas células, o que caracteriza as doenças mitocondriais <sup>(1, 2, 4, 9)</sup>. Os tecidos mais acometidos são aqueles com maior necessidade de ATP como por exemplo o sistema nervoso central que consome 20% da produção corpórea de ATP <sup>(4)</sup>. As manifestações mais comuns da doença podem ser epilepsia mioclônica, ataxia e nistagmo <sup>(3)</sup>. A expressão fenotípica da doença é muito variável pois DNAm mutado e normal coexistem na mesma célula (heteroplasmia) e a proporção de mutantes pode mudar em células-filhas durante a divisão celular <sup>(3, 4)</sup>.

Os defeitos moleculares encontrados são basicamente rearranjos de grande escala (deleções e duplicações), depleção e mutações de ponto <sup>(1)</sup>. A maioria das mutações de DNA em ponto ocorrem em genes de RNA transportador (RNAt). Dentre elas, talvez a mais estudada seja

a transição AG na posição 8344 no gene de RNAt de lisina (RNAt<sup>Lys</sup>), a mutação que causa MERRF <sup>(10)</sup>. A maioria dos pacientes com MERRF apresentam essa mutação, porém não é exclusiva de MERRF <sup>(3)</sup>. Como o DNAm<sup>t</sup> está localizado no citoplasma sua herança não segue as leis mendelianas, sendo herdado exclusivamente através da linhagem materna mas ambos os sexos são afetados igualmente <sup>(3,4)</sup>.

As doenças mitocondrias são relativamente novas. Os primeiros relatos dessas doenças são da década de 60 mas somente na década de 90 que houve maior avanço nos métodos diagnósticos mais eficientes. Portanto, é difícil a realização de pesquisas epidemiológicas <sup>(1)</sup> e relatos de casos de grande amostragem.

O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica a respeito de MERRF e doenças mitocondriais em geral, enfocando principalmente aspectos genéticos e as bases das doenças. Outros aspectos desenvolvidos serão diagnóstico, aspectos clínicos e tratamento.

## **2. Histórico**

### **2.1.O Nascimento da Medicina Mitocondrial (1959-1962)**

Em 1959, os primeiros estudos bioquímicos de uma organela celular foram realizados seguindo observações feitas na beira do leito de um paciente com sintomas neurológicos nunca antes vistos. Constatado que tal paciente possuía uma taxa de metabolismo basal muito elevada, partiu-se para a hipótese de acometimento de mecanismos que regulavam o consumo de oxigênio a nível celular. Os estudos passaram a se concentrar na mitocôndria do músculo esquelético. Em 1960, estudos com ratos comprovaram que a mitocôndria era responsável pela respiração celular e pela fosforilação oxidativa. Observou-se ainda, a importância da produção de ATP e sua relação com a respiração mitocondrial. Apesar desta estar normal, o ATP mostrava-se em níveis muito diminuídos <sup>(11)</sup>.

A microscopia eletrônica demonstrou acúmulo mitocondrial de diferentes tamanhos em células musculares. Os achados bioquímicos e estruturais da Doença de LUFT tiveram grande impacto no desenvolvimento das bases da patofisiologia mitocondrial na década de 70.

A presença de DNA na mitocôndria foi inicialmente mostrada em 1963 por Nass e Nass <sup>(12)</sup> em embriões de galinhas.

### **2.2. O Crescimento no Campo da Doença Mitocondrial**

No início da década de 70, constatou-se que as aberrações na cadeia respiratória com ou sem as alterações estruturais na mitocôndria encontradas na doença de LUFT, também ocorriam

em outras miopatias. Em 1970 – 1972, foram notificadas doenças envolvendo sistema nervoso central e músculo esquelético associadas a deficiências na cadeia respiratória. No ano seguinte, foram notificados os primeiros casos de deficiência isolada de carnitina muscular.

Tais descobertas clínicas foram o ponto inicial para a rápida expansão da pesquisa da patofisiologia mitocondrial. Em 1981, a sequência completa do DNA mitocondrial foi elucidada<sup>(13)</sup>. Em 1988, uma revisão abrangente<sup>(14)</sup> das bases bioquímicas da doença mitocondrial classificou mais de 120 entidades. Desde então inúmeras revisões passaram a elucidar as alterações, não apenas bioquímicas, bem como estruturais e moleculares das doenças mitocondriais. A idéia de doença multissistêmica associada a um defeito específico na função mitocondrial, porém dependente de variação genética e fatores ambientais, passou a ser aceita e estudada mais profundamente.

### **2.3. Futuro**

Os desafios para os que trabalham no campo das doenças mitocondriais incluem um melhor entendimento da patogênese inicial que atinge o DNA mitocondrial e, principalmente, o desenvolvimento de tratamentos efetivos. A produção de modelos animais com mutações no DNA mitocondrial é muito importante<sup>(15)</sup>.

### 3. Epidemiologia

Pouco se sabe sobre a frequência das doenças mitocondriais, em parte porque os primeiros relatos de distúrbios desse grupo são da década de 60 (ver Histórico). Na verdade, somente na década de 90 é que houve um avanço na identificação, caracterização e classificação dessas doenças por meios diagnósticos mais eficientes. Em estudo recente de 204 e pacientes realizado no Instituto Nazionale Neurológico “C. Besta”, em Milão, a frequência de distúrbios mitocondriais em relação aos de outros grupos de patologias neurometabólicas (doenças lisossômicas de depósito, doenças dos peroxissomos, acidúrias orgânicas, por exemplo) foi de 25%. Hoje, estima-se que a frequência de doenças mitocondriais seja de aproximadamente 1:10.000 nascidos vivos, porém análises estatísticas mais precisas da população devem ser feitas, buscando números mais recentes em diferentes populações <sup>(1)</sup>.

## 4. Aspectos Gerais da Mitocôndria

### 4.1. A Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas encontradas em todas as células dos eucariontes e que têm a função de transformar a energia química dos metabólitos em energia facilmente acessível à célula<sup>(2, 8, 16)</sup>. Essa energia é acumulada em compostos lábeis ricos em ligações energéticas, dos quais o principal é o trifosfato de adenosina (ATP), que prontamente cede sua energia quando a célula necessita dela para trabalho, quer seja osmótico, mecânico elétrico ou químico. As mitocôndrias são organelas esféricas ou alongadas, medindo de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura e até 10  $\mu\text{m}$  de comprimento. Sua distribuição na célula varia, tendendo a se acumular no citoplasma onde o gasto de energia é mais intenso, por exemplo, no pólo apical das células ciliadas ou na peça intermediária de espermatozoides. A mitocôndria é constituída principalmente por proteínas, e em segundo lugar por lipídios<sup>(8)</sup>. Existem também pequena quantidade de RNA e DNA, sendo que a mitocôndria possui sistema genético próprio<sup>(1, 2, 4, 5, 6, 7, 8)</sup>. Como quase todos os componentes celulares, a mitocôndria tem vida curta, sendo constantemente renovada. Experimentos feitos em células de fígado de ratos mostram que a vida média das proteínas mitocondriais é de aproximadamente 10 dias<sup>(8)</sup>. As mitocôndrias mostram, no microscópio eletrônico, uma estrutura característica. Apresentam-se constituídas por duas membranas: a externa é lisa, ao passo que a interna apresenta invaginações que podem assumir a forma de cristas ou túbulos, que servem para aumentar consideravelmente a superfície da membrana<sup>(2, 8, 17, 18)</sup>. A maior parte das mitocôndrias tem cristas no seu interior. Fazem exceção às das células que sintetizam esteróides, que apresentam principalmente formações tubulares, além de cristas. Entre

as cristas ou túbulos da mitocôndria existe uma matriz amorfa, rica em proteínas. Em muitos tipos celulares observam-se, na matriz, grânulos arredondados e elétron-densos, que são ricos em cálcio e magnésio. Estes estão relacionados com a capacidade mitocondrial de concentrar cátions<sup>(8)</sup>.

As moléculas energéticas (glicídios, lipídios) são inicialmente degradadas no citoplasma e a degradação continua nas mitocôndrias pelas enzimas do ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs) e da fosforilação oxidativa, produzindo água, CO<sub>2</sub> e energia. Foram descritas pequenas partículas arredondadas de mais ou menos 9 nm de diâmetro, que se prendem por um pedúnculo à face interna da membrana interna da mitocôndria. São as partículas elementares, que contêm as enzimas da fosforilação de ADP (difosfato de adenosina) transformando-a em ATP. As partículas elementares são constituídas por várias proteínas formando um complexo que apresenta atividade ATP sintetase capaz de formar ATP a partir de ADP e fósforo inorgânico<sup>(8, 17)</sup>. A teoria mais aceita sobre o funcionamento das mitocôndrias (teoria quimiosmótica) admite que a síntese de ATP ocorre às expensas de um fluxo de prótons através das partículas elementares<sup>(8, 17)</sup>.

A quantidade de mitocôndrias e o número de cristas por organela são proporcionais ao metabolismo das células. As que apresentam alto metabolismo, como é o caso das células do músculo estriado cardíaco, têm grande quantidade de mitocôndrias, com elevado número de cristas dispostas compactamente.<sup>(8)</sup>

As mitocôndrias podem ter funções especializadas em tipos particulares de células. O ciclo da uréia, por exemplo, é a rota metabólica central pela qual os mamíferos eliminam os produtos finais do metabolismo celular que contenham nitrogênio. Esses produtos são excretados na urina na forma de uréia. Enzimas da matriz mitocondrial codificadas pelo núcleo são responsáveis por várias etapas do ciclo. A síntese de uréia ocorre somente em alguns tecidos, como o fígado, e as enzimas necessárias são sintetizadas e importadas para as mitocôndrias somente nestes tecidos. Adicionalmente, os complexos enzimáticos respiratórios da membrana mitocondrial interna de mamíferos contêm várias subunidades protéicas, que são tecido-específicas e codificadas pelo núcleo, acreditando-se que atuem como reguladoras do transporte de elétrons. Assim, alguns seres humanos com certa doença muscular genética apresentam uma subunidade defectiva na citocromo-oxidase; como a subunidade é específica às células



musculares esqueléticas, as suas outras células, incluindo as células musculares cardíacas, funcionam normalmente, permitindo aos indivíduos sobreviverem<sup>(7)</sup>.

#### 4.2. Origem da Mitocôndria

O caráter peculiar do sistemas genéticos das mitocôndrias sugerem que elas evoluíram, assim como o cloroplasto, de bactérias endocitadas há mais de um bilhão de anos. De acordo com essa hipótese endossimbiótica, as células eucarióticas iniciaram suas existências como organismos anaeróbicos, sem mitocôndrias ou cloroplastos, e então estabeleceram uma relação endossimbiótica com uma bactéria, cujo sistema de fosforilação oxidativa foi subvertido pelas células para seu próprio uso. O evento endocítico que levou ao desenvolvimento das mitocôndrias presumivelmente ocorreu quando o oxigênio entrou na atmosfera em quantidades substanciais, há cerca de  $1,5 \times 10^9$  anos, antes que animais e plantas tenham surgido<sup>(7, 19)</sup>.

Uma vez que a maioria dos genes codificantes das atuais proteínas mitocondriais está no núcleo celular, parece claro que uma extensa transferência de genes ocorreu do DNA das organelas para o DNA nuclear durante a evolução eucariótica. Isso explicaria porque alguns genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriais assemelham-se a genes bacterianos: a seqüência de aminoácidos da enzima mitocondrial *superóxido dismutase* de pintos, por exemplo, assemelha-se muito mais à enzima mitocondrial à enzima bacteriana correspondente do que a outras enzimas superóxido dismutases encontradas no citosol da mesma célula eucariótica. Outra evidência de que tais transferências de DNA tenham ocorrido durante a evolução vem da descoberta de que algumas seqüências não-codificantes do genoma nuclear parecem ser de origem mitocondrial recente; elas parecem ter se integrado ao genoma nuclear como “DNA lixo”<sup>(7)</sup>. O mais provável é que as mitocôndrias sejam descendentes de um tipo particular de bactéria púrpura fotossintetizante que perdeu a habilidade de conduzir a fotossíntese, tendo remanescido com somente uma cadeia respiratória. Não está claro, entretanto, se as mitocôndrias se originaram a partir de um único evento endocítico, pois algumas das características das mitocôndrias de protozoários, por exemplo, diferem o suficiente das mitocôndrias animais e vegetais para sugerir uma origem também diferente<sup>(7)</sup>.

Segundo a hipótese endossimbiótica, um sistema genético próprio para as mitocôndrias pode ser explicado por contingências evolutivas. Isso significaria que o processo pelo qual os endossimbiontes transferiram a maior parte dos seus genes para o núcleo (mais de 90 proteínas mitocondriais são codificadas por genes nucleares<sup>(4, 7)</sup> terminou antes que tivesse completo. As transferências seguintes devem ter sido descartadas pelas alterações recentes do código genético mitocondrial, que tornou os genes mitocondriais não-funcionantes quando transferidos para o núcleo<sup>(7)</sup>.

### 4.3. A Fosforilação Oxidativa

Como já visto, as mitocôndrias têm a função de transformar a energia química dos metabólitos em energia facilmente acessível à célula<sup>(2, 7, 8)</sup>. Assim, membrana mitocondrial interna pode ser separada em cinco complexos enzimáticos responsáveis pela fosforilação oxidativa mitocondrial, chamados complexos I, II, III, IV e V (Quadro 1), compostos por subunidades responsáveis pelo transporte de elétrons através da membrana intramitocondrial<sup>(1, 2, 6, 17, 20)</sup>.

Os complexos respiratórios contêm ainda subunidades que são codificadas pelo DNA nuclear, as quais são sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos e, depois, importadas para as mitocôndrias, onde vão ser conjugadas com as subunidades codificadas pelo mtDNA nas respectivas holoenzimas<sup>(1,4, 7)</sup>.

Segundo a hipótese quimiosmótica (hipótese de Mitchell), a energia livre gerada pelo transporte de elétrons pela cadeia respiratória é usada para produzir ATP a partir de ADP + Pi<sup>(2, 8, 17)</sup>. O complexo I remove elétrons do NADH enquanto o complexo II coleta elétrons do succinato. Ambas as enzimas, então, transportam os elétrons para a coenzima Q (CoQ). Da CoQ, os elétrons circulam através do complexo III para o citocromo c, em seguida para o complexo IV, e finalmente o oxigênio produz água<sup>(2, 6)</sup>. Esta necessidade de oxigênio torna o processo de transporte de elétrons uma cadeia respiratória, a qual responde pela maior parte da utilização corporal de oxigênio<sup>(17)</sup>. A energia gerada é liberada por esta cadeia transportadora de elétrons, sendo usada para a bomba de prótons por intermédio da membrana mitocondrial interna, criando

um gradiente eletroquímico. Este gradiente é utilizado pelo complexo V como uma fonte de energia potencial para condensar ADP e Pi e fabricar ATP. O ATP formado é então trocado por ADP através da membrana mitocondrial interna pelo transportador de adenina nucleotídeo, sendo que o ADP pode ser ressintetizado em ATP <sup>(2, 6, 17)</sup>.

Quadro1: Complexos enzimáticos que compõem a cadeia respiratória mitocondrial

Complexo Enzimático	Número de Subunidades Nucleares	Número de Identificações das Subunidades Mitocondriais
I (NADH) - coenzima Q óxido-redutase	Aproximadamente 40	7 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6)
II - succinato desidrogenase-CoQ-óxido-redutase	4	0
III - coenzima Q citocromo C-óxido-redutase	11	1 (citocromo b)
IV - citocromo c oxidase ou COX	13	3 (COXI, COXII, COIII)
V - ATP sintetase	14	2 (ATPase 6 e 8)

1. (Adaptado de Souza AFM, Giugliani R. *Doenças Mitocondriais*. In: Carakushanski E. *Doenças Genéticas em Pediatria*. Ed. Guanabara Koogan, RJp: 189-195, 2001.).

#### 4.4. DNA e Herança Mitocondrial

As mitocôndrias têm suas próprias moléculas de DNA, ocorrendo em várias cópias por organela e consistindo de 16.569 pares de bases dispostos em uma molécula bifilamentar circular<sup>(1, 2, 4, 5, 6, 7, 20)</sup>. A transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA) ocorre nas mitocôndrias, independentemente do núcleo<sup>(4)</sup>. As moléculas de mtDNA contêm 37 genes <sup>(1)</sup> que codificam codificam 2 RNAs ribossômicos, 22 RNAs transportadores e 13 RNS mensageiros (RNAm) que são traduzidos em 13 polipeptídios envolvidos na fosforilação oxidativa<sup>(1, 2, 4, 6, 7, 19, 20, 21)</sup> (outros 90 ou mais genes do DNA nuclear também codificam polipeptídios que são transportados para as mitocôndrias para participar da fosforilação oxidativa) <sup>(1, 4, 7)</sup>. Essas proteínas codificadas são essenciais componentes de 4 dos 5 complexos responsáveis pela fosforilação oxidativa mitocondrial <sup>(1, 2, 6)</sup>. O complexo II é formado exclusivamente por subunidades codificadas pelo DNA nuclear (nDNA) <sup>(1)</sup>. O genoma mitocondrial é compacto e sem íntrons <sup>(1, 7)</sup>.

A segregação e transmissão do genoma mitocondrial em humanos compõem-se de complicados processos, que são particularmente importantes na compreensão da herança e anormalidades clínicas das doenças mitocondriais<sup>(5)</sup>.

A genética do mtDNA possui marcantes diferenças com a dos cromossomos nucleares (Quadro 2). Em primeiro lugar, ao contrário do DNA nuclear, o mtDNA é herdado exclusivamente através da linhagem materna<sup>(1, 4, 7, 17, 18)</sup>, não seguindo os princípios da genética mendeliana, mas sim os da genética das populações<sup>(22)</sup>. O zigoto só possui mitocôndrias provenientes do óvulo, que possui cerca de 100.000 cópias de DNA, uma vez que os espermatozoides só possuem algumas moléculas de DNAm<sup>t</sup> (cerca de 100 cópias)<sup>(16, 22)</sup> que não entram no ovócito<sup>(1, 4, 7, 17, 18)</sup>. A questão é ainda controversa, visto que um pequeno número de moléculas de mtDNA paterno pode escoar até o zigoto<sup>(5, 16)</sup>, sendo diluída ou excluída por mecanismos ainda desconhecidos<sup>(1, 16)</sup>. Para fins didáticos, podemos considerar que a maioria das alterações patogênicas no mtDNA tem associação com hereditariedade materna, ou seja, as mães transmitem a deficiência para toda a sua descendência, mas somente as filhas transmitirão a doença adiante<sup>(1, 4, 5)</sup>. Entretanto, ao contrário de mutações de ponto no RNAm<sup>t</sup>, transmitidas maternamente, múltiplas deleções são transmitidas como herança autossômica dominante ou, mais raramente, autossômica recessiva. Essas desordens de herança mendeliana têm sido descritas como defeitos na sinalização intergenômica, isto é, mutações nos genes nucleares que predisõem a rearranjos no DNAm<sup>t</sup><sup>(23)</sup>.

Um segundo aspecto da genética do mtDNA é que cada célula humana possui centenas de mitocôndrias, e cada uma contém muitas moléculas de mtDNA<sup>(1, 2, 6, 18)</sup>. O número de moléculas de DNAm<sup>t</sup> por célula varia consideravelmente, mas células somáticas mononucleares contêm tipicamente na ordem de 1000 a 5.000 cópias<sup>(5, 16)</sup>. Durante a divisão celular, a mitocôndria é distribuída randomicamente para as células-filhas, que, em condições normais, são compostas por uma única espécie de DNAm<sup>t</sup>, situação chamada de homoplasmia<sup>(1, 2, 5, 16, 22)</sup>. Porém, com uma alta taxa de divisões e mutações, podem coexistir, dentro da mesma célula, moléculas normais e moléculas mutadas, condição denominada de heteroplasmia<sup>(1, 2, 4, 5, 16, 22)</sup>.

Devido a poliploidia mitocondrial durante a meiose, ocorre uma distribuição aleatória do DNAm<sup>t</sup> mutado pelas células-filhas durante cada divisão celular, fenômeno conhecido como

segregação mitótica<sup>(1, 3)</sup>. As mudanças na proporção de alelos mutantes podem ocorrer por variação aleatória (idêntico ao conceito de deriva genética) ou devido a uma vantagem seletiva (por exemplo, deleções produzem uma molécula de DNAm<sub>t</sub> mais curta que pode replicar mais rapidamente que uma molécula inteira).<sup>(4)</sup>

A heteroplasmia do DNAm<sub>t</sub> é uma causa importante de expressividade variável das doenças mitocondriais. Quanto maior a proporção de moléculas mutantes de DNAm<sub>t</sub>, mais grave será a expressão da doença<sup>(4)</sup>, denotando a existência de um limiar de expressão<sup>(1)</sup>. A expressão fenotípica de uma mutação mitocondrial também depende da natureza da mutação, da sua distribuição tecidual, bem como da necessidade energética do órgão no qual ocorre o dano molecular. Por exemplo, músculo, cérebro, olhos e coração são mais vulneráveis, pois dependem mais da energia gerada na mitocôndria. Genes nucleares, polimorfismos mitocondriais, bem como idade, sexo, fatores ambientais, apesar de pouco estudados, também têm um papel na expressão fenotípica das mutações do DNAm<sub>t</sub><sup>(1)</sup>.

Outra diferença é que, ao contrário do genoma nuclear, que é organizado linearmente<sup>(24)</sup>, o genoma mitocondrial se dispõe em molécula circular<sup>(1, 2, 4, 5, 6, 7)</sup>. Também destaca-se a ausência de íntrons, presentes no DNA nuclear<sup>(1, 4, 7, 19)</sup>. Além disso, em contraste com o DNA nuclear, ambos os filamentos do DNA são transcritos e traduzidos. Já no código genético, o DNAm<sub>t</sub> difere do código universal em muitos aspectos: UGA (expresso, habitualmente, em termos de código do RNAm) codifica triptofano e não término. AUA codifica metionina, e não isoleucina; AGA e AGG são de término e não códons de arginina. Além disso, as terceiras posições - que são a principal fonte de redundância do código - mais freqüentemente são A e C (e menos G ou T) que no genoma nuclear<sup>(18)</sup>.

A taxa de mutação do DNAm<sub>t</sub> é cerca de dez vezes maior que a do DNA nuclear. Isto é causado pela falta dos mecanismos de reparo do DNA no DNAm<sub>t</sub>, e também possivelmente pelos danos causados pelos radicais livres de oxigênio liberados durante o processo de fosforilação oxidativa<sup>(4, 17)</sup>.

Quadro 2: Principais diferenças entre o DNA mitocondrial e o DNA nuclear

DNA mitocondrial	DNA nuclear
Circular	Linear
Sem íntrons	Com íntrons
Herança maternal	Herança mendeliana
16.569 pares de bases	7 bilhões de pares de bases
37 genes	100.000 genes

#### 4.5. Transcrição e Replicação do DNAm

A transcrição da cadeia pesada (*H-strand*) inicia no promotor de cadeia-H (HSP) e procede em sentido anti-horário começando com os 2 RNAs ribossomais, e inclui 12 RNAs mensageiros que codificam proteínas da fosforilação oxidativa, assim como 14 RNAs transportadores. A transcrição de cadeias leves (*L-strand*) inicia no promotor de cadeia leve (LSP) e procede em sentido horário, começando com *primers* de RNA para replicação e, após a alça D, codificando 8 dos 22 RNAs transportadores e 1 RNA mensageiro. Cadeias longas de RNA policistrônicas são formadas e subseqüentemente clivadas precisamente em espécies separadas de RNA <sup>(21)</sup>.

Quadro 3: Produtos da Transcrição Genômica Mitocondrial

Transcrição da Cadeia Leve	Transcrição da Cadeia Pesada
Primers de RNA	2 RNAs ribossomais (12s e 16s)
8 RNAs transportadores (P, E, S, Y, C, N, A, Q)	14 RNAs transportadores (F, V, L, I, M, W, D, K, G, R, H, S, L, T)
1 RNA mensageiro (ND6)	12 RNAs mensageiros

A replicação de RNAm<sub>t</sub> requer *primers* de RNA sintetizados ao longo do promotor de cadeia. As cópias das cadeias são replicadas como as cadeias progenitoras, sendo as moléculas-filhas liberadas como círculos livres. A nova molécula de DNAm<sub>t</sub> de cadeia dupla é formada pela remoção dos *primers* de RNA, introdução de anéis super-helicais e fechamento do círculo. Na tradução, os 13 genes codificadores de proteína compreendem: *complexo I ou NADH desidrogenase*: 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6); *complexo III*: citocromo b; *complexo IV ou citocromo c oxidase*: subunidades I, II, e III; e *complexo V ou ATP sintetase*: subunidades 6 e 8. Os 22 genes de RNA para 20 aminoácidos compreendem: *cadeia leve*: prolina, ácido glutâmico, serina, tirosina, cisteína, asparagina, alanina, glutamina; *cadeia pesada*: fenilalanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptofano, ácido aspártico, lisina, glicina, arginina, histidina, serina, leucina, treonina<sup>(21)</sup>.

## 5. Doenças Mitocondriais

### 5.1. Etiologia

O grupo de doenças relacionado as alterações nas mitocôndrias, podem ter uma origem ligada à defeitos na estrutura genética do DNA mitocondrial (excluídos, aqui os defeitos no DNA nuclear que irá levar, posteriormente as mutações no DNA mitocondrial, e, da mesma forma, os defeitos da sinalização intergenômica) e a fatores externos. Sendo aqueles muito mais freqüentes que estes. Algumas outras causas, entretanto, podem ser citadas como possíveis causas de mutações no DNA mitocondrial porém, ainda devem ser elucidadas.

### 5.2. Defeitos Genéticos

A doença mitocondrial quando originada exclusivamente do DNA mitocondrial propriamente dito, pode ser resultada de mutações de ponto ou rearranjos de grande escala (deleções e duplicações):

- Deleção – é a perda de um segmento cromossômico, resultando em desequilíbrio do cromossomo;
- Duplicação – originada, freqüentemente, de um “crossing-over” desigual resultando, também em um desequilíbrio cromossômico;
- Mutações de Ponto – substituição de um único nucleotídeo numa seqüência de DNA, podendo alterar o código de uma trinca de base e levar à substituição de um aminoácido por outro no produto gênico<sup>(24)</sup>.

As mutações mais freqüentes em determinado gene do DNA mitocondrial variam conforme a doença (Quadro 4).



Quadro 4. Aspectos clínicos e moleculares de algumas doenças mitocondriais

Doenças	Características Clínicas	Gene Mitocondrial	Mutações
Atrofia óptica hereditária de Leber	Perda visual (central) na segunda ou terceira década de vida	ND1, ND4, ND6	De ponto: 3460 A, 11778 A, 14484C
MELAS	AVCs antes dos 40 anos, demência, enxaqueca, convulsões	RNA <sub>t</sub> <sup>leu(UUR)</sup>	De ponto: 3243 G, 3271
MERRF	Epilepsia mioclônica, ataxia, miopatia, neuropatia, demência	RNA <sub>t</sub> <sup>lys</sup>	De ponto: 8344G 8356C
Oftalmoplegia externa progressiva	Ptose, fraqueza dos músculos extra-oculares e membros	RNA <sub>t</sub> <sup>Asn</sup>	De ponto: 5692G Deleções múltiplas
Miopatia com cardiomiopatia hipertrófica	Fraqueza muscular, miopatia	RNA <sub>t</sub> <sup>Ile</sup>	De ponto: 4317G, 4269G
Diabete com Surdez	Diabetes melito II, surdez neurossensorial	RNA <sub>t</sub> <sup>leu(UUR)</sup>	De ponto: 3243G, Deleções e Duplicações do DNA mitocondrial

(Adaptado livremente de Carakushanski, Everson – Doenças genéticas em pediatria; Ed Guanabar Koogan, RJ 2001)

As mutações no DNA mitocondrial podem ocorrer em células somáticas ou germinativas. Nos casos de mutações em células da linhagem somática, há uma notável relação entre grau de mutação (tanto mutações de ponto como rearranjos de grande escala) e idade do paciente acometido. Mutações em tais células são causadas, provavelmente, pelo efeito direto dos radicais oxigênio, conforme discutido posteriormente. Assim, quanto mais velho o indivíduo, maior a

probabilidade de apresentar mutações nas células somáticas, de maneira suficientemente expressiva a ponto de apresentar alguma expressão fenotípica <sup>(6)</sup>.

Enquanto mutações somáticas determinam o tempo e a progressão da doença mitocondrial, mutações no DNA mitocondrial herdado definem a natureza e a severidade das manifestações clínicas. Assim, a variação genética em células da linhagem germinativa é produto tanto de novas quanto de antigas mutações, que agiram na seleção de um mesmo organismo <sup>(6)</sup>.

Portanto, a maioria das manifestações polimórficas que existem na população, ocorreram há muito tempo e, desde então, segregaram-se para *homoplasmia*. Contrastando com esta observação, diversas mutações deletérias severas são eliminadas através da seleção natural, na forma de doenças incompatíveis com a vida ou com a reprodução da espécie

### **5.3. Fatores Externos**

Embora sejam inúmeros os fatores externos apontados como possíveis causadores de doenças mitocondriais, poucos apresentam explicações científicas plausíveis. Dentre eles, está o tratamento para o Vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

A replicação do DNA mitocondrial é promovida pela DNA-polimerase  $\gamma$ ; esta enzima, por sua vez, é inibida pelos inibidores da transcriptase reversa. As drogas utilizadas no tratamento da AIDS, por atuarem de tal forma, podem induzir uma deleção no DNA mitocondrial, resultando em defeitos na cadeia respiratória e na fosforilação oxidativa. Tais efeitos foram inicialmente observados em pacientes tratados com Zidovudina, que desenvolveram miopatia com fibras vermelhas rotas e baixos níveis de DNA mitocondrial. Ainda, corroboram estudos que relacionam lipodistrofia como efeito adverso do tratamento para AIDS, bem como sinal de doença mitocondrial <sup>(15)</sup>.

### **5.4. Relação com Infecções**

Em estudo recente <sup>(15)</sup> observou-se uma alta frequência de infecções de repetição do trato genito-urinário e respiratório, em pacientes portadores de doenças mitocondriais. A maioria dos

episódios neurodegenerativos clinicamente importantes associados com doenças mitocondriais ocorreram durante ou logo após episódios de infecções comuns como otite média, sinusite e gastroenterite.

A hipótese apresentada é a existência de uma relação entre as citocinas de defesa do organismo e a apoptose da mitocôndria. Entretanto, o mecanismo específico continua desconhecido, o que requer maiores investigações sobre o assunto<sup>(15)</sup>.

## 6. Genética de MERRF

### 6.1. Etiologia

Dentre as 50 mutações em ponto do DNA mitocondrial (DNAmt) já reportadas, que causam doença em humanos, 35 ocorrem em genes de RNAt. Dentre elas, talvez a mais estudada seja a transição A→G na posição 8344 do gene do RNAt<sup>Lys</sup><sup>(1)</sup>, mutação que ocorre na maioria dos pacientes com MERRF(80 a 90% dos casos), altamente específica para esta doença mas não exclusiva<sup>(2, 3, 10, 23, 26, 27)</sup>. Muitos dos casos restantes são devidos a uma transição T→C na região 8363 do mesmo gene.<sup>(2, 9)</sup> Ambas as mutações são consistentemente heteroplásmica em pacientes e nunca foram encontradas em controles.<sup>(2)</sup> Outra mutação ocorre no gene RNAt<sup>Leu</sup>, uma transição A→G na região 3243 que é usualmente ligada à Encefalopatia Mitocondrial, Acidose Láctica e Acidente Vascular Cerebral (MELAS), outra doença mitocondrial.<sup>(9)</sup> Existe ainda um relato de família com MERRF que carregava uma mutação no mesmo gene no nucleotídeo 8356<sup>(28)</sup> e casos de mutação na região 3243 do gene de RNAt<sup>Leu(UUR)</sup>, a última apresentando sintomas mistos de MERRF e oftalmoplegia progressiva externa.<sup>(29)</sup>

Recentemente foram descobertas outras mutações relacionadas ao MERRF, uma transição G→A na região 8363 no gene RNAt<sup>Lys</sup> e uma transição A→G na região 8296 no gene RNAt<sup>Lys</sup>, que ocorre em associação com a mutação G8363A análise de fibras musculares mostrou níveis significativamente aumentados de genomas G8363A em citocromo *c* oxidase-negativas (indicativo de MERRF) do que em fibras normais, e níveis quase homoplásmicos da mutação A8296G em ambas as fibras. As duas mutações não foram encontradas em controles. A mutação

G8363A é dita patogênica e a co-ocorrência com mutação A8296G é de pouco claro significado e é um raro polimorfismo.<sup>(30)</sup>. A figura a seguir mostra as mutações citadas no RNAt<sup>Lys</sup>:

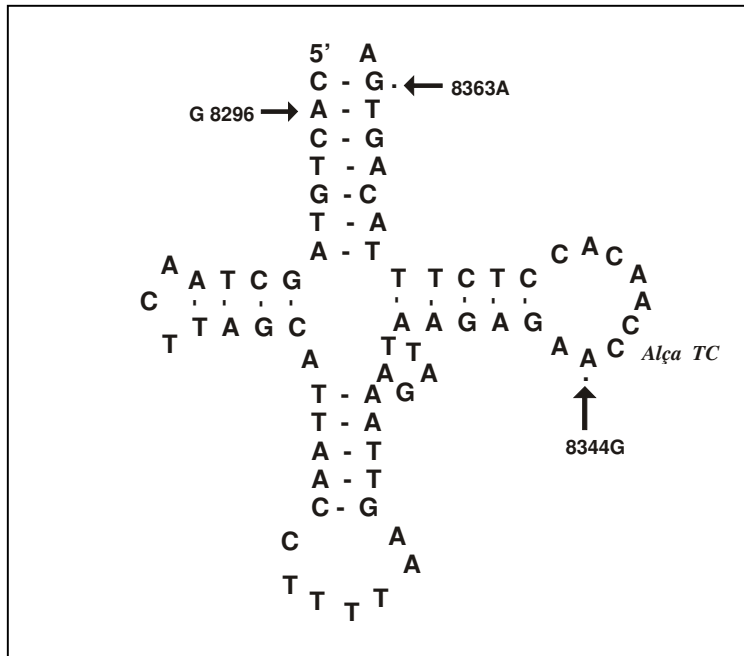


Fig.1. Representação esquemática do RNAt<sup>Lys</sup> mitocondrial, mostrando a posição das mutações e a alça universal TC, onde ocorre a mutação A8344G.(Adaptado de Arenas J, Campos MS, Bornstein MD *et al.* A double mutation (A8296G and G8363A) in the mitochondrial DNA tRNA Lys gene associated with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers. *Neurology* 52:377-382, 1999.

## 6.2. Bases Moleculares

A mutação A8344G no gene de RNAt<sup>Lys</sup> causa uma terminação prematura da tradução em cada ou perto de cada códon de lisina, sendo a deficiência na aminoacilação do RNAt<sup>Lys</sup> (em geral, de 50 a 60%) a principal causa do fenômeno<sup>(9, 29, 30)</sup>. Esse fenômeno leva a uma severo defeito na síntese proteica mitocondrial, que foi encontrado associado à mutação A8344G em mioblastos e fibroblastos de músculo esquelético de pacientes<sup>(2)</sup>. Há acúmulo de peptídeos mitocondriais truncados pelo término prematuro da tradução afetando preferencialmente

polipeptídeos maiores<sup>(2, 9)</sup>. A diminuição da síntese proteica leva a um déficit geral na taxa de respiração mitocondrial e do consumo de oxigênio em células e tecidos<sup>(9)</sup>.

Um efeito da mutação na acurácia do processamento do transcrito policistrônico do qual o RNAt Lys é derivado foi estudado pelos resultados de análise de RNA gel-blot. Ambos o RNAm maduro correspondente aos genes adjacentes e o RNAt<sup>Lys</sup> eram do tamanho correto em mutantes. Entretanto, o mesmo tipo de análise revelou que o nível do RNAt<sup>Lys</sup> em mitocôndrias mutantes estava diminuído em 18 a 35%. E ainda, usando condições de isolamento e eletroforese que detecta a ligação aminoácido e RNAt, foi encontrado que a proporção de RNAt<sup>Lys</sup> que foi mutado estava diminuída em células mutantes em 30 a 40%. Em resumo, a combinação dos dois fatores (quantidade e eficiência da aminoacilação) produz um nível de lysil-RNAt<sup>Lys</sup> 50 a 60% menor em células mutantes do que em controles.<sup>(10)</sup>

No caso do polipeptídeo menos afetado na sua taxa de síntese, ND6, que possui apenas dois resíduos de lisina, a taxa de formação da proteína madura em células com 98% de RNAt<sup>Lys</sup> mutado, foi de apenas 40% em relação à linhagem celular controle. É improvável que a pequena quantidade de gene RNAt Lys normal poderia contar com a síntese de proteína observada nessas células. Essas células eram capazes de incorporar 3H-lisina em vários produtos de tradução mitocondrial exceto ND4L, que não tem códon de lisina na sua matriz de leitura. Esses resultados indicam um funcionamento substancial do RNAt mutante na elongação e também sua capacidade de não incorporar resíduos de lisina em códons de outros aminoácidos ou outros aminoácidos em códons de lisina.<sup>(10)</sup>

Assim como a mutação na posição A8344G do MERRF, uma mutação na posição 8356 no gene RNAt<sup>Lys</sup> produz uma tradução anormal do tamanho do produto RNAt alterado. Além dessas 2 mutações no RNAt<sup>Lys</sup>, nenhuma outra mutação mitocondrial no RNAt tem causado término prematuro da tradução. Portanto, no sistema mitocondrial humano, códons de lisina parecem ser os únicos que têm habilidade de causar término prematuro da tradução quando o suprimento de RNAt carregado é baixo.<sup>(1)</sup>

### 6.3. Bases Bioquímicas e Fisiopatológicas

Análise enzimática do material da biópsia muscular de pacientes com MERRF revelou atividades reduzidas de enzimas da cadeia respiratória. Especialmente afetadas são a NADH desidrogenase, ou complexo I, que contém 7 subunidades sintetizadas na mitocôndria, e a citocromo *c* oxidase, ou complexo IV, que contém 3 dessas subunidades<sup>(9, 10)</sup>. A ATP sintase e o complexo III são geralmente menos afetados<sup>(9)</sup>. Entretanto tem-se encontrado resultados inconsistentes nos estudos bioquímicos musculares, incluindo defeitos do complexo III; complexos II e IV; complexos I e IV; complexos I, III e IV; ou apenas complexo IV.<sup>(3)</sup>

Os efeitos da mutação na síntese proteica da mitocôndria revelou que além das 13 proteínas normalmente sintetizadas na mitocôndria, vários peptídeos anormais eram também produzidos. E ainda, a taxa dos 13 produtos de tradução normais em células mutantes era consideravelmente diminuída, um achado não surpreendente, considerando que a mutação ocorreu em um gene de RNAt. Polipeptídeos com um grande número de resíduos de lisina têm apenas uma pequena probabilidade de serem completos. Três subunidades do complexo I e uma subunidade do complexo IV têm 10 resíduos de lisina e eram sintetizados em 10% da taxa normal em células com RNAt mutantes, o que explica o grande defeito respiratório e bioquímico observados em biópsias musculares de pacientes com MERRF.<sup>(10)</sup>

Durante a respiração aeróbica normal a mitocôndria consome O<sub>2</sub> e forma água. Durante esse processo, 4 elétrons são adicionados e a energia liberada é conservada em forma de ATP. Os oxidantes químicos, -O<sub>2</sub> e -OH são produtos normais do processo oxidativo. Entidades com elétrons não pareados e com propriedades reativas são denominadas *radicais*. Esses radicais podem ser prejudiciais quando produzidos em grandes quantidades e não neutralizados pelos antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatatião peroxidase, vitamina E, coenzima Q, carotenóides, vitamina C). Esse processo pode levar ao dano de lipídios de membranas celulares, DNA, proteínas e outras macromoléculas.<sup>(11)</sup>

Tem sido proposto que mutações no DNAm e mudanças na bioenergética celular contribuem para o processo de envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças degenerativas. A capacidade de fosforilação oxidativa diminui com a idade devido ao acúmulo de DNA mitocondrial e/ou nuclear defeituoso. A produção de ATP pode cair abaixo do nível crítico de

funcionamento da célula. Além disso, a concentração de RNAm e RNAr mitocondrial diminui com a idade em coração e cérebro de ratos e está associada com diminuição de 50% da taxa de transcrição. Como sinal do envelhecimento, o número de fibras dos músculos esqueléticos e cardíaco citocromo *c* oxidase negativas aumentam com a idade, e a atividade enzimática dos complexos I e IV diminuem progressivamente no músculo esquelético humano e fígado. Além disso, evidências têm sido apresentadas para mudanças relacionadas à idade nos níveis de coenzima Q em diversos tecidos humanos e de ratos.<sup>(11)</sup>

A falência de órgãos em uma doença com déficit na fosforilação oxidativa está relacionada à maior ou menor necessidade de ATP do tecido. Nesses casos os órgão mais afetados são: sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, rim, fígado, retina e ilhotas pancreáticas<sup>(11)</sup>. No MERRF, as manifestações clínicas são principalmente relacionadas à falência de tecidos nervoso e muscular.<sup>(31)</sup>

O SNC obtém sua energia quase exclusivamente da fosforilação oxidativa e consome uma grande quantidade de oxigênio. O peróxido de hidrogênio é produto de várias enzimas de importância no SNC e da autooxidação de diversas substâncias endógenas. Qualquer distúrbio no equilíbrio entre oxidação e antioxição no SNC pode comprometer a eficiência do transporte de elétrons. Isso poderia diminuir a disponibilidade de funções celulares como as do canais de K ATP-dependente, bombas de Ca, bombas de Na/K, excitose e vários processos de fosforilação. Outro possível processo que leva ao stress oxidativo no SNC poderia envolver o neurotransmissor excitatório glutamato. Ativação de receptores de glutamato em culturas de tecido leva a um desbalanço na oxidação/antioxição, oque pode acompanhar um dano acumulativo ao DNA, proteínas e lipídios e eventualmente à degeneração neuronal.<sup>(11)</sup> Sabe-se que no mecanismo das convulsões, participam as sinapses excitatórias que empregam glutamato e áreas de morte celularpode desenvolver sinapses hiperexcitáveis novas que são capazes de gerar convulsões.<sup>(3)</sup>

No músculo esquelético, a proliferação mitocondrial leva à formação de fibras vermelhas anfractuosas parece ser desencadeada por um desequilíbrio entre a necessidade de enregia e a eficiência da oxidação/ fosforilação da fibra muscular.<sup>(3)</sup>



Mutações deletérias do DNAm<sup>t</sup> apresentaria, como seu último efeito, uma diminuição da produção de ATP. Nesse sentido, uma das mais intrigantes questões é como uma específica mutação de ponto produz uma perda de função celular em um tecido específico causando uma doença diferente da causada por outra mutação do DNAm<sup>t</sup>.<sup>(10)</sup>

#### 6.4. Herança

A mutação G8344A é classificada como uma mutação do DNAm<sup>t</sup> moderadamente deletéria, portanto com severidade moderada dos sintomas. Uma mutação moderadamente deletéria apresenta prognóstico pior do que mutações menos deletérias e é mais rapidamente eliminada por seleção. São, portanto, mutações relativamente recentes, que aparecem em diferentes haplótipos de DNAm<sup>t</sup>, e são freqüentemente heteroplásmicas.<sup>(6)</sup> genes nucleares, polimorfismos mitocondriais, idade, sexo e fatores ambientais, apesar de pouco estudados, também têm um papel na expressão fenotípica das mutações de DNAm<sup>t</sup>.<sup>(1)</sup>

As mutações em ponto do DNAm<sup>t</sup>, são herdadas exclusivamente pela linhagem materna<sup>(1, 32)</sup>, ao contrario de rearranjos de DNAm<sup>t</sup> que são esporádicos e não são transmitidos a gerações subseqüentes<sup>7</sup>. As mutações de genes de RNAt são geralmente heteroplásmicas e assim como outras mutações de DNAm<sup>t</sup> necessitam que o nível crítico de DNAm<sup>t</sup> mutante deve ser excedido para a expressão da doença (limiar de expressão). Uma mulher que apresenta uma mutação heteroplásmica do DNAm<sup>t</sup> pode transmitir uma pequena quantidade de DNAm<sup>t</sup> mutante para um filho (que pode não ser clinicamente afetado) e uma alta carga de mutação para outro filho ( que pode desenvolver achados clínicos de doença do DNAm<sup>t</sup>)<sup>(1, 32)</sup>. Como resultado, existe uma variação extensiva genotípica e fenotípica entre os componentes de uma mesma família. Em mães com <40% de DNAm<sup>t</sup> mutante para A8344G no RNAt<sup>Lys</sup> no sangue, a prole não foi afetada. Acima desse nível, mães com maiores níveis de DNAm<sup>t</sup> mutante em seu sangue apresentaram uma maior proporção de filhos afetados, atingindo um máximo de 78% de prole afetada para mães com 80% ou mais de DNAm<sup>t</sup> mutado no sangue. Mães com 80% ou mais de DNAm<sup>t</sup> mutante no sangue apresentaram 22,56 vezes mais chances de terem um filho afetado do que mães com <60% de DNAm<sup>t</sup> mutante no sangue. Esses resultados indicam também que mães com alto nível de A8344G são ainda capazes de terem filhos.<sup>(32)</sup>

As mutações A3243G (MELAS) e A8344G (MERRF), ambas envolvem genes de RNAt mitocondrial e elas têm efeitos similares sobre a função da cadeia respiratória mas apresentaram diferenças entre o risco de transmissão da mutação de mãe para filho. Essas diferenças podem ser reflexo de diferentes expressões das duas mutações em indivíduos afetados, e não por diferentes mecanismos de transmissão das moléculas de DNAm<sub>t</sub>. Mecanismos moleculares patogênicos diferentes ou diferentes padrões de segregação tecidual podem contribuir para essas diferenças. essa variabilidade é pelo menos em parte devida à redução e posterior proliferação dos genomas mitocondriais no oócito em desenvolvimento.<sup>(32, 33)</sup>

### 6.5. Correlação Genótipo/Fenótipo

A mutação 8344 RNAt<sup>Lys</sup> como muitas mutações RNAt, ocorre em um estado heteroplásmico: o paciente com MERRF carrega alelos mutantes e normais do gene. Essa mutação também está sujeita à segregação replicativa, então as manifestações clínicas variam marcadamente entre os parentes maternos.<sup>(6)</sup> A proporção de DNA mutante varia entre indivíduos com MERRF e entre tecidos do mesmo indivíduo. Os parentes do probando que carrega a mutação não são frequentemente afetados, ou podem exibir somente sintomas mais leves como perda de audição e ataxia. Esses parentes geralmente têm uma menor proporção de DNAm<sub>t</sub> mutante do que o probando<sup>(6, 10)</sup>. Essas diferenças podem ser explicadas por duas variáveis: a porcentagem de DNAm<sub>t</sub> mutante herdada e a idade do paciente.<sup>(6)</sup>

Uma análise detalhada das associações entre apresentação clínica, defeito bioquímico e genótipo do DNAm<sub>t</sub> em uma grande família com MERRF e mutação G8344A revelou uma forte correlação entre genótipo e fenótipo quando a idade fosse também uma variável. Dentre os que tivessem 19 a 24 anos de idade nesta família, um indivíduo com 15% do DNAm<sub>t</sub> normal no músculo esquelético obteve uma capacidade energética mitocondrial muscular, como determinado atividade enzimática de fosforilação oxidativa e fenótipo normal, exibindo somente leves mudanças ao eletroencefalograma. Em contraste, um com 20 anos de idade com somente 5% de DNAm<sub>t</sub> muscular obteve reduzida capacidade de energia mitocondrial e sintomas mais severos, com o probando apresentando menos de 25% da capacidade energética muscular normal. Similarmente, parentes maternos com 40 a 50 anos de idade com 10% de DNAm<sub>t</sub> normal

mostrou maior capacidade de energia muscular e fenótipos mais leves comparado com indivíduos mais velhos com metade do nível de DNAm normal que exibiram metabolismo energético diminuído e sintomas severos.<sup>(2)</sup>

Essas observações suportam a hipótese de que em famílias que carregam mutações moderadamente deletérias, como a G8344A, os parentes da mãe permanecem relativamente não-afetados até que a segregação meiótica ou mutação somática aumente a porcentagem de DNAm mutante para atingir o limiar de expressão<sup>(6)</sup>. A maior severidade dos problemas clínicos de um sujeito mais velho com o mesmo genótipo de DNAm reflete um achado geral de doenças devidas a mutações no DNAm comprometendo a síntese proteica, mostrando retardo no aparecimento das manifestações e aumento progressivo com a idade, com a idade de início refletindo a porcentagem de DNAm mutante na herança individual.<sup>(2)</sup>

Estudos *in vitro* com linhagens de células com RNAt mutante e normal coexistindo na mesma mostraram que a mutação A8344G causa um defeito na cadeia respiratória mitocondrial e déficit na síntese proteica mitocondrial, promovido quando um específico limiar (~85%) de DNAm mutante é atingido. Como o nível de DNA mutante varia entre os indivíduos, e também entre órgãos e tecidos em um indivíduo, é geralmente aceitável que a variação na proporção do DNAm mutante é o principal fator responsável pela variada expressão clínica dos defeitos de DNAm. Entretanto um estudo mostrou uma discrepância entre o limiar de 85% para a expressão bioquímica do DNAm mutante e o limiar para a expressão clínica. Essa disparidade é provavelmente resultado do mosaïcismo celular dos níveis de DNAm mutante. A função ótima de qualquer órgão é dependente da interação de numerosas células. A disfunção de um pequeno grupo de células interagindo pode, no entanto, levar à falência do órgão, e embora os níveis de DNAm mutante possa ser alto em células mal funcionantes, o nível médio no tecido pode ser baixo. Por isso, indivíduos com <60% DNAm mutante no tecido nervoso central e músculo esquelético podem ter uma profunda síndrome neurológica incapacitante.<sup>(31)</sup>

## 7. Aspectos Clínicos

Os pacientes com MERRF podem ser normais durante os anos iniciais do desenvolvimento. Contudo, com o tempo desenvolvem epilepsia mioclônica e ataxia progressiva associadas à disartria e nistagmo; alguns tem atrofia óptica. Alguns pacientes apresentam anormalidades da sensibilidade profunda e pé cavo. Sinais menos comuns incluem demência, perda auditiva, neuropatia periférica e espasticidade. A deterioração intelectual é lentamente progressiva . A exemplo da MELAS , um número significativo de pacientes tem história familiar positiva e baixa estatura. <sup>(1)</sup>

Em um estudo comparativo entre as frequências dos sintomas entre MELAS e MERRF observou-se que haviam diferenças estatisticamente significativas entre os seguintes sintomas: AVC de repetição, diabetes melito , retinopatia pigmentar, miopatia , lipoma, atrofia ótica, neuropatia, ataxia e mioclonia. Não foram detectadas diferenças significativas entre fraqueza, demência , epilepsia e estatura baixa. <sup>(31)</sup>

As frequências observadas para cada manifestação clínica do MERRF foram as seguintes: acidente vascular cerebral de repetição 1%: CPEO (oftalmo plegia crônica progressiva externa) 6%; diabetes melito 3%; retinopatia pigmentar 0%, fraqueza 39%, demência 25%; epilepsia 43%, miopatia 70%, estatura baixa 13%, lipoma 8%, atrofia ótica 13%, neuropatia 24%, ataxia 50% e mioclonia 61%. <sup>(31)</sup>

## 8. Diagnóstico nas Doenças Mitocondriais

### 8.1. Diagnóstico Clínico

A suspeita clínica diante de possível doença mitocondrial deve ser incitada no profissional da área da saúde sempre que determinados sinais e sintomas estiverem presentes. Como as doenças mitocondriais atingem inúmeros órgãos, a apresentação geralmente é sistêmica.

Praticamente todos os tecidos do organismo dependem, em diferentes graus, do metabolismo oxidativo, podendo ser afetados por mutações no DNA mitocondrial. Desta forma, os pacientes frequentemente procuram auxílio devido às manifestações sistêmicas, sendo esta a primeira chance de se considerar a doença mitocondrial como hipótese diagnóstica <sup>(22)</sup>.

No caso da apresentação multissistêmica, um paciente com acidose láctica congênita, que estivesse, hipoteticamente, associada à disfunção no transporte intramitocondrial de elétrons, manifestaria logo nos primeiros dias de vida: dificuldades para ganhar peso, hipotonia generalizada, atraso nas aquisições neurológicas e, provavelmente, hospitalização por descompensação metabólica. Além disso, poderia se apresentar com cardiomiopatia, ptose, surdez neurosensorial, disfunção tubular renal e progredir para o óbito por insuficiência ventilatória até os 18 meses de vida <sup>(1)</sup>.

As manifestações neurológicas das doenças mitocondriais, envolvendo tanto os sistemas nervoso central e periférico são amplamente conhecidas, uma vez que o cérebro é o órgão mais suscetível à privação de oxigênio. A sintomatologia clínica pode incluir atraso do

desenvolvimento psicomotor, convulsões, encefalopatia, mioclonias, surdez, acidente vascular cerebral, ataxia cerebelar e neuropatia periférica <sup>(1)</sup>.

Menos conhecidos são os sinais não-neurológicos das doenças mitocondriais. Manifestações oftalmológicas são muito comuns, envolvendo praticamente todo o sistema visual: da córnea até os músculos extra-oculares e o córtex occipital. Os principais sinais são oftalmoplegia, neuropatia ótica, retinopatia pigmentar e defeitos no campo visual cortical <sup>(22)</sup>.

Achados relacionados ao sistema cardíaco também são comuns, podendo representar risco à vida. Tais achados se relacionam com os achados musculares da doença, que também podem se manifestar por, apenas, intolerância a exercícios e mioglobínúria. Na musculatura cardíaca, apresentam-se as arritmias, bloqueio cardíaco, morte súbita e miocardiopatia hipertrófica, que se inicia com hipertrofia septal e se acompanha de apnéia, dispnéia, cianose e bronquite no período neonatal. A evolução é desfavorável e rapidamente fatal <sup>(22)</sup>.

As manifestações endócrinas são freqüentes e a incidência do *diabete melitus* é alta. Células da ilhota pancreática são extremamente ativas metabolicamente sendo, portanto, suscetíveis à falha na fosforilação oxidativa. Diabetes associado à mutações no DNA mitocondrial é principalmente causado por um defeito na secreção de insulina <sup>(22)</sup>.

Manifestações gastrointestinais das doenças mitocondriais incluem pseudo-obstrução colônica, hepatopatia e perda de peso. Manifestações renais que sugerem tais doenças são nefrite tubular intersticial, síndrome nefrótica e insuficiência renal, dificilmente como achado isolado e sim, associado a manifestações neuromusculares. Entretanto, o achado renal mais freqüente é a tubulopatia renal proximal (Fanconi renal) <sup>(1)</sup>.

Finalmente, doenças mitocondriais podem apresentar-se hematologicamente através da Síndrome de Pearson, uma doença rara, com início na infância, e que cursa com anemia sideroblástica, insuficiência do pâncreas exócrino, em muitos casos evoluindo para pancitopenia com êxito letal.

## 8.2. Diagnóstico Histopatológico

O músculo é o tecido ideal para a investigação morfológica e bioquímica dos efeitos patogênicos das mutações no DNA mitocondrial, por terem essas células grandes necessidades energéticas e um índice muito baixo de renovação. Os doentes com doenças mitocondriais apresentam freqüentemente as fibras vermelhas rotas (*ragged red fibers*), obtidas através de cortes de criostato, corados pelo tricrômio de Gomori, ficando com aparência avermelhada pelo acúmulo anormal de mitocôndrias sob a membrana sarcolemal, destacando-se nitidamente da coloração normal esverdeada do sarcoplasma.

A presença de fibras vermelhas rotas não ocorre em todos os casos, mas, quando aparece, é quase patognômico de patologia mitocondrial<sup>(1)</sup>.

## 8.3. Diagnóstico Bioquímico

*Determinação do Estado de Oxirredução no Plasma:* A alteração neste estado é conseqüência 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 lactato/piruvato nos afetados. Isso é particularmente notado nos períodos pós abortivos, quando mais NAD é necessários para adequado metabolismo dos substratos glicolíticos. Da mesma maneira, em conseqüência da deficiência do ciclo de Krebs, a síntese de corpos cetônicos aumenta após as refeições, ao invés de diminuir, devido ao direcionamento da acetilCoA para cetogênese. Portanto, a triagem para os defeitos genéticos da fosforilação oxidativa, como já foi descrito, deve incluir a determinação de lactato, piruvato e corpos cetônicos. Quando a acidemia láctica estiver elevada, haverá indicação para determinação do lactato no líquido e para determinação da respectiva razão L/P após o teste de sobrecarga de glicose.<sup>(1)</sup>

*Atividade das Enzimas Respiratórias Mitocondriais:* Diante dos índices de oxirredução alterados, deve-se seguir para a investigação da atividade enzimática, idealmente realizada em tecido muscular fresco. Essas investigações incluem a medida do consumo de oxigênio pela mitocôndria isolada, chamada de polarografia e a dosagem da atividade enzimática de cada complexo da cadeia respiratória por espectrofotometria. Simultaneamente à dosagem enzimática

dos complexos, é importante determinar a atividade da enzima do ciclo de Krebs, citrato sintetase. <sup>(1)</sup>

#### **8.4. Diagnóstico Molecular**

*Detecção de Deleções, Duplicações e Depleções:* habitualmente realizadas pela técnica de “Southern Blot” que fornece informação quanto à quantidade de DNA mitocondrial presente, presença/ausência de deleções ou duplicações e sobre a proporção de DNA mitocondrial mutado no caso de uma mutação heteroplásmica. A quantificação do DNA mitocondrial presente num determinado tecido também é efetuada pelo método de “Southern-Blot” . <sup>(1)</sup>

*Mutações de Ponto:* detectáveis através do estudo de polimorfismos de comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP) de regiões do DNA mitocondrial que tenham sido amplificadas por PCR. As mutações novas podem ser detectadas através do estudo de polimorfismos de conformação de cadeia única e seqüenciamento do DNA mitocondrial. O diagnóstico diferencial deve levar em conta outras doenças multissistêmicas que cursam com cardiopatia, cardiomiopatias, surdez neurosensorial e surdez induzida por aminoglicosídeos. <sup>(1)</sup>

Sobre o estudo de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição: pouco após a aplicação do “Southern-blot” no final da década de 70, descobriu-se que nem todas as pessoas possuem a mesma distribuição de sítios de enzima de restrição. Embora se pudesse prever a existência de alguma variação de nucleotídeos pelo que se sabia sobre mutação e polimorfismos de proteínas, o grau de variação detectado pelo “Southern-blot” foi uma surpresa. <sup>(1)</sup>

Como as enzimas de restrição têm seqüências de reconhecimento específicas no DNA, as alterações da seqüência do DNA genômico que decorrem de mutação hereditária ou nova acarretam a criação ou abolição de sítios de clivagem, desse modo alterando o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA evidentes após o “Southern-blot” e hibridização com uma sonda de DNA clonada. Como se dispõe de várias centenas de enzimas de restrição para detecção de uma grande variedade de seqüências de reconhecimento de quatro a oito pares de bases, esse método permite um exame extenso da seqüência de nucleotídeos na vizinhança imediata de uma dada sonda de DNA clonado. As variações nos sítios de restrição do DNA detectadas desta maneira é



que se denominam polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição. Os variados comprimentos dos fragmentos constituem alelos codominantes num locus do DNA. Assim, pode-se examinar um “Southern-blot” e interpretar esses diferentes comprimentos como um reflexo do genótipo (a seqüência de DNA) num determinado sítio de restrição. Os RFLPs também podem surgir de deleção ou inserção de DNA, em vez de alterações de nucleotídios isolados. Se um segmento de DNA entre dois sítios de restrição for deletado ou inserido, o resultante tamanho do fragmento de restrição é diferente.<sup>(24)</sup>

### **8.5. Diagnóstico Imagético**

Geralmente feito por Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética; em tais estudos, observam-se alterações patológicas como leucodistrofia, calcificações, atrofia cortical e lesões simétricas em gânglios da base, sendo estas típicas da encefalopatia de Leigh. A atrofia do nervo óptico pode ser observada em pacientes com LHON, NARP e MILS<sup>(1)</sup>.

### **8.6. Diagnóstico Pré-Natal**

O diagnóstico pré-natal é uma área pouco abordada na literatura atual que versa sobre doenças mitocondrias. Métodos moleculares para diagnóstico pré-natal ainda não estão disponíveis. Cogita-se que o diagnóstico pré-natal poderia ser feito analisando atividades da cadeia respiratória que, por sua vez, seriam melhor demonstradas através da cultura de amniócitos e do vilo coriônico, colhidos através da amniocentese e fragmentos de vilosidades coriônicas, respectivamente<sup>(34)</sup>.

Mesmo assim, o diagnóstico pré-natal mostraria-se confiável apenas para investigação de doenças mitocondriais em famílias que os pais são consagüíneos e o defeito fosse demonstrado em cultura de fibroblastos. Um viés observável em tais casos é o fato da amostra não abranger todas as mitocôndrias das células, uma vez que as doenças mitocondriais obedecem um limiar de expressão, e seria necessário observar a porcentagem total de células mutantes, e não apenas uma amostra<sup>(34)</sup>.

## 9. Aconselhamento Genético

Aconselhamento genético para desordens da cadeia respiratória permanece como uma das mais desafiadoras áreas no campo da genética humana. Quando a desordem aparece somente em um membro da família afetada, não há história familiar de consanguinidade e não é identificada mutação em outro DNA mitocondrial ou nuclear, é impossível prever com confiança o provável risco de recorrência e precisa-se de outros recursos para obter dados de riscos empíricos <sup>(34)</sup>.

É sugerido que o risco de recorrência para descendência de mulheres afetadas onde a mutação não é conhecida é na ordem de 10 a 20%, enquanto que o risco para descendência de homens afetados é de 1 a 2% <sup>(34)</sup>.

Uma mulher na qual uma mutação específica do DNA mitocondrial foi identificada teria um alto risco de recorrência na sua descendência, mas como nível de heteroplasmia não é sempre relacionado com a severidade da doença, tem sido impossível prever com confiança a severidade da doença em um feto identificado com esta mutação <sup>(34)</sup>.

Com tecnologias mais refinadas na manipulação tecidual e tecnologias reprodutivas é agora possível analisar o genoma mitocondrial de um único ovócito ou em embriões em fase de pré-implantação para auxiliar na previsão do risco de recorrência em mulheres <sup>(34)</sup>.

De qualquer forma, é impossível dizer com certeza se a criança apresentará ou não a doença quando for identificada mutação no DNAm. Isso ocorre porque não sabemos se todas as mitocôndrias de uma célula estão mutadas ou se todas as células apresentam mutação no seu DNAm.

## 10. Tratamento

Tratamentos efetivos e específicos para doença mitocondrial ainda não estão disponíveis. Tratamentos como o dietético com suplementação de vitaminas e co-fatores e o tratamento com fármacos parecem ajudar alguns pacientes, mas não tem sucesso com outros <sup>(35)</sup>.

As estratégias de tratamento visam corrigir o funcionamento anormal da cadeia respiratória, reduzindo a presença dos agentes tóxicos ou corrigindo a deficiência de co-fatores essenciais <sup>(1)</sup>.

O principal objetivo é aumentar a produção de ATP. Para isso, uma variada gama de substâncias tem sido usada, tanto em casos únicos quanto em estudos de casos- controles. O grupo de medicamentos mais investigado é o da coenzima Q e seus derivados quinona, com várias observações relatando regularização do piruvato e do lactato nos pacientes com diversas formas de mitocondriopatias. Entretanto, diversos relatos não evidenciaram resposta laboratorial ou clínica ao uso destes compostos. Os aceptores de elétrons como a menadiona (vitamina K 3) e filoquinona (vitamina K1) e o ácido ascórbico (vitamina C) tem sido usados no sentido de melhorar o transporte de elétrons na cadeia respiratória, porém com resultados clínicos insatisfatórios. A riboflavina (vitamina B2) na dose de 50-100 miligramas dia age como co-fator nos complexos I e II. O dicloroacetato originalmente usado como hipoglicemiante oral também tem sido usado com algum sucesso na redução das taxas de lactato e piruvato, sendo conhecido por estimular o metabolismo oxidativo do tecido cardíaco <sup>(1)</sup>.

O dicloroacetato estimula a piruvato desidrogenase, resultando em diminuição dos níveis de ácido láctico em quase todos os pacientes tratados. Seu uso é restrito a crianças e adultos com altos níveis de ácido láctico no sangue ou líquido cerebrospinal. Tratamento com dicloroacetato

é apropriado somente em casos de acidose láctica primária. Alguns tipos de doença mitocondrial são particularmente responsivas a esse tratamento, especialmente a MELAS. Infelizmente, o tratamento tem efeitos adversos significativos, como lesão de nervos periféricos, necessitando de cuidadosa monitoração. Em alguns pacientes, estes efeitos adversos limitam o uso do dicloroacetato.<sup>(35)</sup>

## 11. Referências Bibliográficas

1. Souza AFM, Giugliani R. Doenças Mitocondriais. In: Carakushanski E. Doenças Genéticas em Pediatria. Ed. Guanabara Koogan, RJ, 2001. Pp: 189-195.
2. Wallace DC, Brown MD, Lott, MT. Mitochondrial Genetics. In: Rimoin DL, Cormor JM, Pybriz RE. Emery and Rimoin's Practice of Medical Genetics. Vol I. 3a ed. Churchill Livingstone. New York, 1997 pp: 277-299.
3. Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM (eds). Nelson Tratado de Pediatria, 15<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1997.
4. Jorde LB, Larey JC, Barnshad MJ, While EL. Genética Médica. 2<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.
5. Howell N, Chinnery PF, Ghosh SS, Fahy E, Turnbull DM. Transmission of the human mitochondrial genome. Humam Reproduction, 15 (2): 235:245, 2000.
6. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. Proc. Aatl. Acad. Sci. USA, 91:8739-8746, 1994.
7. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Biologia Molecular da Célula. 3<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, Editora. Artes Médicas, 1997.
8. Junqueira LC., Carneiro J. (eds).Histologia Básica, 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1999.

9. Antonická H, Floryk D, Klement P *et al.* Defective kinetics of cytochrome *c* oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibers ('MERRF') at position 8344nt. *Biochem J* 342:537-544, 1999.
10. Chomyn A. The Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers Mutation Provides New Insights into Human Mitochondrial Function and Genetics. *Am J Hum Genet* 62:745-751, 1998.
11. Luft, R. – The development of mitochondrial medicine; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 91, pp8731-8738, Sep. 1994
12. Nass S, Nass MMK. (1963), *J Cell Biol.* 19, 613 – 629
13. Anderson S. *et al.* *Nature* 1981, 290, 457 – 465
14. Scholte HRJ. *Bioenerg. Biomembr.* 1981, 20, 161 –191
15. Schapira A. Mitochondrial disorders; *Current Opinion in Neurology* 2000, 13:527-532
16. Rantanen A, Larson NG. Regulation of mitochondrial DNA copy number during spermatogenesis. *Humam Reproduction*, 2000, 15 (2): 86-91.
17. Champe PC., Harvey, RA. *Bioquímica ilustrada*, 2ª ed. Porto Alegre, Editora Artes Médicas, 1997.
18. Vogel F, MoAG. *Genética Humana - Problemas e Abordagens*. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
19. Jansen RPS. Origin and persistence of the mitochondrial genome. *Humam Reproduction*, 2000, 15 (2): 1-10.
20. Wallace, DC. Mitochondrial defects in cardiomyopathy and neuromuscular disease. *American Heart Journal*, 2000. 139(2, Part 3):S70-S85
21. Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Humam Reproduction*, 2000, 15 (2): 11-17.
22. Donald R., Johns – Mitochondrial DNA and disease – *NEJM*, vol. 333:638 – 6444, Sep 7, 1995, Numb 10.

23. Blumenthal DT, Shanske S, Schochet SS, Santorelli FM, DiMauro S, Jaynesm M, Bodensteiner J. Myoclonus epilepsy with ragged red fibers and multiple mtDNA deletions. *Neurology*, 1998. 50:524-525.
24. Thompson MW, McInnes RR Willard HF, Thompson & Thompson: *Genética médica 5ª ed*– Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro RJ, 1993
25. Naviaux, Robert et al – Organismal effects of mitochondrial dysfunction; *Human Reproduction*, Vol. 15, (suppl 2), pp 44-56, 2000
26. Sanger TD, Jain KD. MERRF Syndrome With Overwhelming Lactic Acidosis. *Ped Neurol* 14(1):57-61,1996.
27. Zhou L, Chomyn A, Attardi G, Miller CA. Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers (MERRF) Syndrome: Selective Vulnerability of CNS Neurons Does Not Correlate with the Level of Mitochondrial tRNA<sup>lys</sup> Mutation in Individual Neuronal Isolates. *The Journal of Neuroscience* 17(20):7746-7753, 1997.
28. Howell N, Kubacka I, Smith R, Frerman F, Parks JK, Parker WD. Association of the mitochondrial 8344 MERRF mutation with maternally inherited spinocerebellar degeneration and Leigh disease. *Neurology* 46:219-22, 1996.
29. Verma A, Moraes CT, Shebert RT, Bradley WG. A MERRF/PEO overlap syndrome associated with the mitochondrial DNA 3243 mutation. *Neurology* 46 1334-1336, 1996.
30. Arenas J, Campos MS, Bornstein MD *et al.* A double mutation (A8296G and G8363A) in the mitochondrial DNA tRNA Lys gene associated with myoclonus epilepsy with ragged-red fibers. *Neurology* 52:377-382, 1999.
31. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes. *Brain* 120:1713-1721, 1997.
32. Chinnery PF, Howell N, Lightowlers RN, Turnbull DM. MELAS and MERRF. The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. *Brain* 121:1889-1894, 1998.

33. Poulton J, Macaulay V, Marchington DR. Mitochondrial Genetics'98 Is the bottleneck cracked? *Am J Hum Genet* 62:752-757, 1998.
34. Christodoulou J. Genetic defects causing mitochondrial respiratory chain disorders and disease. *Human reproduction*, Vol. 15, Suppl 2, pp 28-43, 2000
35. Haas R. The use of dichloroacetate in the treatment of Mitochondrial disease. In: Gwynne, J, *The Role of Nutrition in Mitochondrial Diseases*. [www.mitoresearch.com.br](http://www.mitoresearch.com.br)