

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Beatriz Silva Vilela Ribeiro

**Caracterização clínica, neurorradiológica e genética de pacientes
com síndrome de Leigh**

Belo Horizonte
2015

Beatriz Silva Vilela Ribeiro

**Caracterização clínica, neurorradiológica e genética de pacientes
com síndrome de Leigh**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Gurgel Giannetti.

Belo Horizonte

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Ciências da Saúde - Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente

Reitor: Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitora de Pesquisa: Prof. Adelina Martha dos Reis

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Ana Cristina Cortes Gama

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Cláudia Regina Lindgren Alves

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente: Prof. Jorge Andrade Pinto

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente:

Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira

Prof. Jorge Andrade Pinto

Profa. Juliana Gurgel Giannetti

Profa. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Profa. Roberta Maia de Castro Romanelli

Suelen Rosa de Oliveira

Aos meus pais, Carlos Alberto e Maria Aparecida,
meus maiores incentivadores:
vocês são o meu porto seguro!

Aos meus irmãos, Fernando e Roberto,
verdadeiros anjos da guarda!

E, ao meu amor, Álvaro,
por despertar em mim a vontade de ser melhor a cada dia!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de manifestar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

A Deus, sempre em primeiro lugar, que me abençoou a cada passo deste trabalho, iluminando-me e dando-me forças diante de cada obstáculo. Sem Ele nada disso seria possível.

À Dra Juliana Gurgel Giannetti, que despertou em mim o interesse em realizar este projeto de pesquisa e por todos os ensinamentos durante esses anos de convivência! Obrigada pelas oportunidades, pelos ensinamentos profissionais, por ser um exemplo de competência e de dedicação. Obrigada pelos cuidados pessoais dedicados a mim e à minha família; jamais saberemos como agradecer!

Ao Dr. Alexandre Varella Giannetti, por tamanha disponibilidade e dedicação em realizar biópsia muscular em nossos pacientes e por me incentivar a sempre seguir adiante.

À Dr^a. Maria Olívia Rodrigues da Costa e à Dr^a. Maria Teresa Carvalho de Lacerda, pela disponibilidade em reavaliar os exames de neuroimagem neste trabalho, mas também por tantos ensinamentos prévios.

A Marilis Tissot Lara, Maria Juliana Silvério Nahim e Gabriela Palhares Campolina Diniz, que tanto me ajudaram a desenvolver este trabalho, ensinando-me a trilhar cada caminho para concluir o Mestrado. Jamais esquecerei as palavras de apoio e de carinho que vocês dispensaram a mim.

A Luciana Maria Rocha Bísvaro e Livia Curvelo Uliana, amigas-irmãs que ganhei durante a Residência de Neurologia Pediátrica, para as quais não me canso de dizer que nada seria tão agradável se não fosse com elas.

À equipe de Neurologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, que sempre me acolheu com tanto carinho.

Aos meus pais, que acompanharam todo o processo, sempre com muita expectativa e com apoio incondicional!

Aos meus irmãos, por acreditarem sempre em mim e estarem sempre ao meu lado. São realmente meus anjos da guarda!

Ao meu noivo, Álvaro, pela paciência, pelo companheirismo e principalmente por me ensinar a enxergar o mundo de uma maneira mais simples e mais feliz!

Aos meus sobrinhos e afilhados, por serem uma fonte constante de alegria em minha vida!

Às minhas amadas amigas de infância, de colégio, de faculdade, de residência e de toda a vida, por entenderem minha ausência, minha ansiedade e por sempre terem uma palavra de conforto.

Aos pacientes e suas famílias, por permitirem a realização deste trabalho!

RESUMO

Introdução: a síndrome de Leigh (SL) é reconhecida como a doença mitocondrial mais comum na infância. Apresenta grande heterogeneidade de manifestação clínica e também do ponto de vista genético, sendo que atualmente existe relato de mutações em mais de 50 genes responsáveis por causar a doença. É causada por mutações tanto no DNA nuclear como no DNA mitocondrial e, assim, diferentes formas de herança podem estar envolvidas: mendeliana (autossômica recessiva ou ligada ao cromossomo X) e materna. O objetivo deste estudo foi caracterizar clínica, neurorradiológica e geneticamente os pacientes com síndrome de Leigh (SL)/síndrome de Leigh-like (SLL) acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-UFMG. **Pacientes e métodos:** realizou-se estudo observacional, transversal, em 18 pacientes com o diagnóstico de SL/SLL que aceitaram participar. Todos foram submetidos à avaliação clínica pelo mesmo neurologista, na qual foi preenchido um protocolo com relevantes dados clínicos e do exame neurológico relacionados à SL. Os exames complementares, como gasometria arterial, dosagem de lactato, eletroneuromiografia (ENMG), resultado de avaliação cardiológica (ecocardiograma), resultado de avaliação oftalmológica - entre outros - foram obtidos dos prontuários médicos. As lâminas de biópsia muscular previamente realizada por ocasião do diagnóstico foram reavaliadas com a orientadora deste estudo. As ressonâncias magnéticas de encéfalo (RME) previamente realizadas foram reavaliadas por duas neurorradiologistas pediatras. Os resultados do estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial realizado pela orientadora do projeto na Columbia University, em 2013, conforme protocolo daquela instituição, foram utilizados nesta pesquisa. Finalmente, pesquisaram-se cinco das mutações de ponto mais comuns no DNA mitocondrial (DNAMit) (3243A>G; 8344A>G; 8993T>G; 8993T>C; 1644T>G). **Resultados:** a idade média dos 18 pacientes avaliados foi de 16,8 anos, o curso clínico da doença mostrou-se crônico e a taxa de mortalidade foi baixa, com apenas um óbito documentado. Encontrou-se lactato sérico aumentado assim como acidemia láctica em frequência menor que a descrita na literatura. À biópsia muscular, apenas um paciente apresentou fibras vermelhas rasgadas; e à histoquímica, uma criança manifestou deficiência total de citocromo C oxidase que, associado a seus achados clínicos, possibilitou o direcionamento da pesquisa do defeito genético subjacente, identificando-se mutações em heterozigose composta no gene SCO2. O estudo bioquímico da cadeia respiratória (EBCR) foi realizado em nove pacientes, mostrou-se normal em seis, com deficiência do complexo I em um paciente e do complexo IV em outro caso. A avaliação dos exames de RME, em 15 pacientes, mostrou acometimento de núcleos da base em 100% dos casos (com acometimento predominante do putâmen) e do tronco encefálico em 20% dos pacientes. A substância branca foi anormal em oito pacientes (53,3%), porém em graus variados, sendo mais evidente e difuso em dois casos, correspondendo a 13,3%. Nenhum dos pacientes exibiu as mutações do DNAMit pesquisadas. **Conclusão:** entre os achados clínicos destacou-se taxa de sobrevivência maior que a descrita na literatura, que pode ser consequência de os defeitos genéticos prevalentes na população estudada diferirem do encontrados em outros países. Em relação aos exames laboratoriais, a dosagem sérica de lactato esteve alterada em poucos pacientes, mostrando que este não é um exame de triagem muito sensível. Os exames de ressonância magnética de encéfalo reavaliados evidenciaram achados típicos da SL, com envolvimento predominante em núcleos da base, mais frequentemente em putâmen. A

espectroscopia por ressonância mostrou-se um método com mais sensibilidade para detecção de aumento de lactato e, por isso, deveria ser realizado rotineiramente na investigação de pacientes com suspeita de SL ou doenças mitocondriais. O estudo histopatológico com análise histoquímica e bioquímica da cadeia respiratória (CR) mitocondrial mostrou-se normal na maioria dos pacientes, concordante com os achados descritos na literatura. Nos casos em que houve alteração do EBCR, os achados específicos auxiliaram na condução do estudo genético. Em relação aos achados moleculares, considerando-se que as encefalopatias mitocondriais da infância, incluindo a SL/SLL, são mais frequentemente causadas por genes nucleares, o estudo por sequenciamento de nova geração utilizando-se painéis ou o estudo de todo o exoma é, atualmente, considerado uma ferramenta mais eficaz na investigação desses pacientes. Uma família desta casuística foi recentemente submetida ao estudo do exoma, que revelou uma mutação nova em homozigose no gene *SUCLA2* em dois irmãos. Em outra família, também pelo estudo do exoma, encontrou-se uma mutação em heterozigose composta em um gene recentemente relacionado à SL.

Palavras-chave: Síndrome de Leigh. Encefalopatia mitocondrial. Encefalopatia necrosante subaguda.

ABSTRACT

Introduction: Leigh Syndrome (LS) is recognized as the most common mitochondrial disease in childhood. It presents a great heterogeneity of clinical manifestation and besides, from the genetic point of view, being that there are currently reports of mutations in more than 50 genes responsible for causing such disease. LS is caused by mutations in both nuclear DNA and mitochondrial DNA, and therefore different forms of inheritance may be involved: Mendelian (autosomal recessive or X-linked) and maternal. This study was carried out with the in order to characterize patients with Leigh Syndrome (LS) / Leigh-like Syndrome (LLS) clinically, neuroradiologically and genetically, in the Neuromuscular Disease Outpatient Clinic at HC-UFMG. **Materials and methods:** An observational, cross-sectional study was performed on 18 patients with LS / LLS who accepted to take part in the project. All of them were submitted to clinical evaluation by the same neurologist, in which a protocol with relevant clinical data and neurological examination related to LS was filled. Complementary examinations such as analysis of arterial blood gas, lactate dosage, electroneuromyography (ENMG), results of cardiological evaluation (echocardiogram), results of ophthalmologic evaluation - among others - were obtained from medical records. The muscle biopsy laminas previously performed at the time of diagnosis were reevaluated by the supervisor of this project. Previously performed brain magnetic resonance imaging (MRI) were reevaluated by two pediatric neuroradiologists. The results of the biochemical study of the mitochondrial respiratory chain conducted by the Columbia University project coordinator in 2013, according to that institution's protocol, were used in this project. Finally, 5 of the most common point mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) (3243A> G; 8344A> G; 8993T> G; 8993T> C; 1644T> G) were screened. **Results:** the mean age of the 18 patients evaluated was 16.8 years; the clinical course of the disease was chronic and low mortality rate, with only one documented death. We should say that increased serum lactate was found as well as lactic acidemia at a lower frequency than described in the literature. In the muscular biopsy, only 1 patient had ragged red fibers, and in histochemistry, 1 child had presented a total cytochrome C oxidase deficiency, which, together with their clinical findings, made it possible to target the underlying genetic defect, detecting mutations in composite heterozygotes in the SCO2 gene. The biochemical study of the respiratory chain (BSRC) was performed in 9 patients, it was normal in 6 patients, with complex I deficiency in one patient and complex IV in another patient. As a result, in 15 patients, MRI exams were affected in 100% of the cases (with predominant involvement of the putamen) and in the brainstem in 20% of the patients. The white substance was abnormal in 8 patients (53.3%), but in varying degrees, being more evident and diffuse in two cases, corresponding to 13.3%. None of the patients had the mtDNA mutations screened. **Conclusion:** In the present study, the data evaluated, in general, were in agreement with the literature. Among the clinical findings, a survival rate higher than that one described in the literature was observed, which may be a consequence of the genetic defects prevalent in the studied population vary from those found in other countries. Regarding the laboratory tests, it was pointed out that the serum lactate dosage was altered in a few patients, showing that this is not a very sensitive screening test. The reevaluated magnetic resonance imaging tests presented typical findings of LS, with predominant involvement in basal ganglia, more frequently in putamen. Resonance spectroscopy has been shown

aiming to be a more sensitive method for the detection of lactate increase and therefore should be performed routinely in the investigation of patients suspected of LS or mitochondrial diseases. The histopathological study with histochemical and biochemical analysis of the mitochondrial respiratory chain (RC) was normal in most patients, in agreement with the findings described in the literature. In cases where BSRC was altered, the specific findings helped to conduct the genetic study. Regarding molecular findings, considering the fact that childhood mitochondrial encephalopathies, including LS / LLS, are most often caused by nuclear genes, the next-generation sequencing study using panels or the study of the entire exome is, currently considered a more effective vehicle used in the investigation of these patients. A family of this series was recently submitted to the study of exome, which revealed a new mutation in homozygosis in the SUCLA2 gene in two siblings. In another family, also through the exome study, a mutation in heterozygosis was found composed in a gene recently related to LS.

Keywords: Leigh Syndrome. Mitochondrial encephalopathy. Subacute necrotizing encephalopathy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
BBGD	Doença dos gânglios basais responsiva à biotina
CE	Crise epiléptica
CG	Cromatografia gasosa
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CR	Cadeia respiratória
BVS	Biblioteca Virtual de Saúde
CK	Creatinoquinase
CoQ10	Coenzima Q10
COX	Citocromo C oxidase
CR	Cadeia respiratória
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA _n	DNA nuclear
DNA _{mit}	DNA mitocondrial
dNTP	Desorribonucleotídeos trifosfatados
DPE	Déficit ponderoestatural
EBCR	Estudo bioquímico da cadeia respiratória
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EM	Espectrometria de massa
ENMG	Eletroneuromiografia
FADH	Dinucleotídeo adenina flavina
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FLAIR	<i>Fluid attenuated inversion recovery</i>
GOMORI	Tricômico de Gomori modificado
GTT	Gastrotosmia
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-eosina
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MEDLINE	<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line</i>

MIE	Membro inferior esquerdo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ORO	<i>Oil Red O</i>
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDHc	Complexo da piruvato desidrogenase
PUBMED	Publicações Médicas
RME	Ressonância magnética de encéfalo
RNA	Ácido ribonucleico
RRF	<i>Ragged red fibers</i>
SDH	Succinato deidrogenase
SL	Síndrome de Leigh
SLL	Síndrome de Leigh- <i>like</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNG	Sequenciamento de nova geração
SNP	Sistema nervoso periférico
SNS	Surdez neurossensorial
TC	Tomografia computadorizada
TCC	Tomografia computadoriza de cérebro
TQT	Traqueostomia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	16
REFERÊNCIAS.....	19
2 ARTIGO 1 - SÍNDROME DE LEIGH: ASPECTOS CLÍNICOS, NEURORRADIOLÓGICOS E GENÉTICOS (Artigo de revisão).....	20
2.1 Introdução.....	21
2.1.1 <i>Fisiologia mitocondrial</i>	22
2.2 Critérios diagnósticos da SL.....	26
2.3 Quadro clínico.....	27
2.4 Propedêutica.....	30
2.4.1 <i>Achados laboratoriais</i>	30
2.4.2 <i>Achados de neuroimagem</i>	33
2.5 Aspectos genéticos.....	38
2.6 Diagnóstico diferencial.....	42
2.7 Tratamento.....	43
2.8 Prognóstico.....	44
2.9 Conclusão.....	44
Referências.....	45
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo geral.....	48
3.2 Objetivos específicos.....	48
4 METODOLOGIA.....	49
4.1 Desenho do estudo e casuística.....	49
4.1.1 <i>Critério de inclusão</i>	49
4.1.2 <i>Critérios de exclusão</i>	49

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2016.

4.2 Procedimentos.....	50
4.2.1 Avaliação clínica e exames complementares.....	50
4.2.2 Reavaliação da neuroimagem.....	51
4.2.3 Estudo histológico e histoquímico muscular.....	51
4.2.4 Estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial.....	52
4.2.5 Estudo molecular.....	52
4.3 Aspectos éticos.....	55
REFERÊNCIA.....	55

5 ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, NEURORRADIOLÓGIA E GENÉTICA DOS PACIENTES COM SÍNDROME DE LEIGH/SÍNDROME DE LEIGH-LIKE (Artigo original).....	56
5.1 Introdução.....	57
5.2 Pacientes e métodos.....	59
5.2.1 Desenho do estudo, casuística e metodologia.....	59
5.2.1.1 Critérios diagnósticos para SL.....	59
5.2.1.2 Critérios diagnósticos para SLL.....	60
5.2.1.3 Critérios de exclusão.....	60
5.2.2 Procedimentos.....	60
5.2.2.1 Avaliação clínica e exames complementares.....	61
5.2.2.2 Reavaliação da neuroimagem.....	61
5.2.2.3 Estudo histológico e histoquímico muscular.....	62
5.2.2.4 Estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial.....	62
5.2.2.5 Estudo molecular.....	62
5.3 Resultados.....	64
5.3.1 População de estudo.....	64
5.3.2 Avaliação clínica.....	65
5.3.2.1 Evolução clínica.....	67
5.3.3 Avaliação laboratorial e exames complementares.....	68
5.3.4 Reavaliação de neuroimagem.....	71
5.3.5 Avaliação do estudo bioquímico da cadeia respiratória e avaliação molecular.....	76
5.4 Discussão.....	77

5.4.1 Quadro clínico.....	77
5.4.2 Achados laboratoriais.....	82
5.4.3. Achados à neuroimagem.....	83
5.4.4 Biópsia muscular: histopatologia e estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial.....	87
5.4.5 Estudo molecular: pesquisa das mutações no DNAmít.....	89
5.5 Conclusão.....	91
Referências.....	92
6 ARTIGO 3 - VARIABILIDADE FENOTÍPICA INTRAFAMILIAR ASSOCIADA À MUTAÇÃO NOVA NO GENE SUCLA2.....	95
6.1 Introdução.....	95
6.2 Pacientes.....	97
6.2.1 Pacientes.....	97
6.3 Cromatografia gasosa de ácidos orgânicos/ espectrometria de massa (CG- EM).....	98
6.4 Estudo muscular histoquímico.....	99
6.5 Análise genética.....	99
6.6 Discussão.....	100
Referências.....	103
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
APÊNDICE E ANEXO.....	106

1 INTRODUÇÃO

As doenças mitocondriais consistem em um vasto grupo de fenótipos clínicos e resultam de mutações ou deleções no ácido desoxirribonucleico mitocondrial (DNAmit) ou no DNA nuclear (DNAn), com conseqüente prejuízo ao funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial e diminuição na produção de adenosina trifosfato (ATP), levando à falha de energia na célula¹. São a causa mais frequente de doenças metabólicas em humanos, com prevalência de 1:5.000^{1,2}. Podem manifestar-se a partir de diversos achados neurológicos, incluindo encefalopatia, miopatia e perda auditiva, entre outros. Apresentações com manifestações não neurológicas ocorrem em mais de 30% dos pacientes pediátricos³.

Geralmente, as doenças mitocondriais têm caráter multissistêmico, uma vez que as mitocôndrias estão presentes em todas as células do corpo. Inicialmente podem acometer apenas um órgão, mas com a evolução da doença é comum o acometimento progressivo de outros órgãos e/ou sistemas, principalmente os que são mais dependentes da produção de energia como sistema nervoso central (SNC), musculoesquelético, coração, sistema endócrino e rins¹.

Baseado no conjunto de manifestações clínicas apresentadas, podem-se definir diferentes síndromes clínicas. Entre as síndromes mitocondriais mais comuns da infância, destaca-se a síndrome de Leigh (SL), cuja incidência estimada é de 1:40.000 nascidos vivos^{4,5,6}. Também conhecida como encefalopatia necrosante subaguda, foi descrita primeiramente por Denis Archibaldi Leigh, psiquiatra e neuropatologista britânico, em 1951, na avaliação *post-mortem* de uma criança de sete meses de idade com história de encefalopatia grave e dificuldades respiratórias⁷. Trata-se de doença neurodegenerativa devastadora que, tipicamente, manifesta-se na infância, embora existam relatos de casos de manifestação na adolescência e na vida adulta⁸.

Assim como nas outras doenças mitocondriais, nota-se na SL ampla variabilidade de apresentação clínica, sendo que alguns pacientes apresentam evolução grave e rapidamente progressiva, enquanto em outros o curso é mais lento e com manifestações menos graves. O aparecimento da sintomatologia, frequentemente, é

consequente a algum insulto metabólico, como, por exemplo, infecção, jejum prolongado, cirurgia, entre outros⁸. Os primeiros sinais geralmente aparecem entre três e 12 meses de idade⁶ e podem incluir regressão do desenvolvimento neuropsicomotor, com perda de algumas habilidades já adquiridas. Os principais sinais e sintomas incluem hipotonia ou espasticidade, distonia, crises epilépticas, ataxia, disfagia, ptose, alteração da movimentação ocular e alterações respiratórias⁸. Alguns pacientes relatam acometimento do sistema nervoso periférico, que se manifesta como miopatia ou polineuropatia. Os acometidos também podem exibir *failure to thrive* ou retardo do desenvolvimento precocemente, mas são sinais inespecíficos da doença⁹.

Rahman *et al.* (1996) propuseram alguns critérios estritos para o diagnóstico de SL: a) doença neurológica progressiva com atraso do desenvolvimento motor e intelectual; b) sinais e sintomas de doença do tronco encefálico e/ou núcleos da base; c) aumento do lactato sérico e/ou do lactato no liquor; d) um ou mais dos seguintes: i) achados característicos da SL à neuroimagem (hipodensidades simétricas nos núcleos da base à tomografia computadorizada (TC) ou lesões hiperintensas em sequências ponderadas em T2 à ressonância magnética de encéfalo (RME); ii) alterações neuropatológicas típicas *postmortem* ou iii) neuropatologia típica em um irmão com quadro clínico semelhante. Definiram como síndrome de Leigh-*like* (SLL) aqueles pacientes com fortes achados clínicos, laboratoriais e de imagem, que não podiam ser incluídos nos critérios estritos citados, devido à neuropatologia atípica¹⁰.

Mais recentemente, Baertling *et al.*⁸, em 2014, sugeriram a definição da SL a partir de três aspectos mais comumente descritos e característicos da síndrome: a) doença neurodegenerativa com sintomatologia variável decorrente de; b) disfunção mitocondrial causada por defeito genético hereditário, acompanhado por; c) lesões bilaterais no SNC que podem ocorrer em uma ou mais áreas, sendo as mais frequentemente acometidas: núcleos da base, diencéfalo, tronco encefálico, cerebelo, medula espinhal¹¹.

No ponto de vista genético também há grande heterogeneidade nessa síndrome, que pode ser causada por mutações no DNAn e no DNAmít que codificam

subunidades da cadeia respiratória (CR)⁹, levando à redução da atividade dos complexos I, II, IV ou V da CR, deficiência da coenzima Q10 (CoQ10), deficiência de biotina ou defeitos no complexo da piruvato desidrogenase (PDHc). Alguns desses defeitos são passíveis de tratamento, como reposição de CoQ10 e de biotina. Diferentes formas de herança genética podem estar envolvidas, como herança mitocondrial (materna), traço autossômico recessivo (mutações no DNAn) e herança ligada ao X (defeitos no PDHc).

No estado de Minas Gerais, o Serviço de Neurologia do Hospital das Clínicas de Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) é um dos centros de referência para o atendimento de adultos e de crianças com enfermidades neurológicas. A existência dos Ambulatórios de Doenças Neuromusculares e de Neurogenética, além do Laboratório de Investigação em Doenças Neuromusculares e Neurogenéticas, vem permitindo o estudo detalhado de doenças mitocondriais, inclusive com realização de testes moleculares.

Considerando que a SL é uma importante forma de apresentação de doença mitocondrial na infância e devido à falta de estudos nacionais acerca dessa doença, o presente estudo propõe a caracterização clínica, neurorradiológica e molecular de pacientes com SL acompanhados no HC-UFMG.

Seguindo os critérios estabelecidos na Resolução 03/2010 do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, esta dissertação é apresentada sob a forma de artigos. Foram elaborados três artigos: o primeiro consiste em uma revisão da literatura sobre a SL, com ênfase em seus aspectos clínicos, neurorradiológicos e genéticos. O segundo artigo foi elaborado a partir da avaliação de 18 pacientes com SL/SLL acompanhados no ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-UFMG. O terceiro artigo trata-se de um relato de caso abordando a variabilidade fenotípica intrafamiliar em uma nova mutação do gene SUCLA2.

Ressalta-se que, por se tratar de uma dissertação de mestrado, os artigos estão extensos e usou-se o mesmo padrão de referência bibliográfica para manter a

homogeneidade do trabalho. Quando os artigos forem enviados às revistas científicas para publicação, serão feitas as adaptações necessárias e a tradução para o idioma de referência.

REFERÊNCIAS

- 1- Goldstein AC, Bhatia P, Vento JM. Mitochondrial disease in childhood: nuclear encoded. *Neurotherapeutics*. 2013; 10(2):212-226. Doi:10.1007/s13311-013-0185-6.
- 2- Ardisson A, Lamantea E, Invernizzi F, Zeviani M, Genitrini S, Moroni I, *et al.* Mitochondrial diseases in childhood. *Current Molecular Medicine*. 2014; 14(8):1069-1078.
- 3- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology*. 2002 Nov 12; 59(9):1406-11.
- 4- Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatric Neurology*. 2008 Oct; 39(4):223-35. Doi: 10.1016.
- 5- Ronchi D, Cosi A, Tonduti D, Orcesi S, Bordoni A, Fortunato F, *et al.* Clinical and molecular features of an infant patient affected by Leigh disease associated to m.14459G> A mitochondrial DNA mutation: a case report. *BMC Neurology*. 2011; 11: 85. Published online 2011 Jul 12. Doi: 10.1186/1471-2377-11-85.
- 6- Ruhoy IS, Saneto RP. The genetics of Leigh syndrome and its implication for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics*. 2014; 7:221-234. Doi:10.2147/TACG.S46176.
- 7- Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal Neurosurgical Psychiatry*. 1951; 14, 216.
- 8- Baertling F, Rodenburg RJ, Schaper J, Smeitink JA, Koopman WJ, Mayatepek E, *et al.* A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *Journal Neurologic Neurosurgical Psychiatry*. 2014 Mar; 85(3):257-65. Doi: 10.1136/jnnp-2012-304426.
- 9- Naess K, Freyer C, Bruhn H, Wibom R, Malm G, Nennesmo I, *et al.* MtDNA mutations are a common cause of severe disease phenotypes in children with Leigh syndrome. *Biochemical Biophysical Acta*. 2009 May; 1787(5):484-90. Doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.014.
- 10-Rahman S, Block RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, *et al.* Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annual Neurology*. 1996 Mar; 39(3):343-51.
- 11- Sofou K, De Coo IFM, Isohanni P, Ostergaard E, Naess K, De Meirleir L, *et al.* A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014; 9:52. Doi:10.1186/1750-1172-9-52.

2 ARTIGO 1 - SÍNDROME DE LEIGH: ASPECTOS CLÍNICOS, NEURORRADIOLÓGICOS E GENÉTICOS

(Artigo de revisão)

Resumo

O presente artigo trata-se de revisão bibliográfica não sistemática da literatura, cujo objetivo foi rever a literatura referente a aspectos clínicos, neurorradiológicos e genéticos de pacientes com o diagnóstico de síndrome de Leigh (SL). Foram utilizadas as bases de dados de Publicações Médicas/ *Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line* (PUBMED/MEDLINE) e Biblioteca Virtual de Saúde (BVS). As doenças mitocondriais consistem em um vasto grupo de fenótipos clínicos e resultam mutações ou deleções no DNA nuclear (DNAn) ou no DNA mitocondrial (DNAmit). De acordo com as manifestações de cada paciente, é possível definir diferentes síndromes clínicas, sendo que a síndrome de Leigh é a forma mais comum da infância, com incidência estimada de 1:40.000 nascidos vivos. Os pacientes podem evoluir com diferentes graus de gravidade e comprometimento, notando-se que evoluem para óbito rapidamente e outros podem apresentar até períodos de estabilidade do quadro. Por se tratar de doença que resulta de alteração no funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial e pelo fato de as mitocôndrias estarem presentes em todas as células do corpo, as manifestações clínicas geralmente são multissistêmicas, com acometimento mais precoce de órgãos ou sistemas com maior demanda energética, como cérebro, músculos, rins, sistema endócrino. Após um período normal de desenvolvimento, as primeiras manifestações clínicas, geralmente, aparecem posteriormente a um evento metabólico agudo, como infecção, por exemplo. As principais manifestações no sistema nervoso central incluem atraso ou regressão do desenvolvimento psicomotor, nistagmo, oftalmoparesia, atrofia óptica, ataxia, paralisia de nervos cranianos, fraqueza generalizada, distonia, hipotonia, disfagia e alterações respiratórias. O acometimento do sistema nervoso periférico pode exibir-se como miopatia ou polineuropatia. As principais manifestações não neurológicas incluem hipertricosose, *failure to thrive*, cardiomiopatia, vômitos e diarreia. A avaliação laboratorial pode revelar acidose láctica e aumento dos níveis de lactato no sangue e no líquido cefalorraquidiano. Dosagem de ácidos orgânicos na urina pode encontrar-se alterada pela presença de metabólitos do ciclo de Krebs, o que sugere disfunção mitocondrial. Os achados mais característicos da SL à ressonância magnética de encéfalo são lesões focais, simétricas, bilaterais, hiperintensas em sequências ponderadas em T2 nas seguintes topografias: gânglios basais, tálamos, substância negra, núcleo rubro, tronco encefálico, substância branca cerebelar, córtex cerebelar, medula espinhal. Além da grande heterogeneidade fenotípica, a SL também tem grande heterogeneidade genética, sendo que, até o momento, já foram descritas mutações em mais de 50 genes diferentes responsáveis por causar a doença.

Palavras-chave: Síndrome de Leigh. Encefalopatia mitocondrial. Alterações genéticas. Alterações de neuroimagem.

Abstract

The present article deals with a non-systematic bibliographic review of the literature, whose objective was to review literature regarding clinical, neuroradiological and genetic aspects of patients with Leigh Syndrome (LS). The PubMed / MEDLINE and VHL (BVL) databases were used. Mitochondrial diseases consist of a large group of clinical phenotypes and result in mutations or deletions in nuclear DNA (nDNA) or mitochondrial DNA (mtDNA). According to the manifestations of each patient, it is possible to set different clinical syndromes, with Leigh syndrome being the most common form of childhood with an estimated incidence of 1: 40,000 live births. Patients may evolve with different degrees of severity and impairment, noting that some patients evolve to death quickly and others may present up to periods of frame stability. Because it is a disease that results from changes in the functioning of the mitochondrial respiratory chain due to the fact that the mitochondria are present in all cells of the body, the clinical manifestations are usually multisystemic, with earlier involvement of organs or systems with a higher energy demand, such as the brain, muscles, kidneys, endocrine system. After a normal period of development, the first clinical manifestations usually appear after an acute metabolic event, such as infection. Major manifestations in the central nervous system include delayed or regressed psychomotor development, nystagmus, ophthalmoparesis, optic atrophy, ataxia, cranial nerve palsy, generalized weakness, dystonia, hypotonia, dysphagia, and respiratory changes. Peripheral nervous system involvement might manifest as myopathy or polyneuropathy. The major non-neurological manifestations include hypertrichosis, failure to thrive, cardiomyopathy, vomiting, diarrhea. Laboratory tests may reveal lactic acidosis and increased lactate levels in the blood and cerebrospinal fluid. Dosage of organic acids in the urine may be altered by the presence of metabolites of the Krebs cycle, a finding that suggests mitochondrial dysfunction. The most characteristic findings of LS to magnetic resonance imaging are focal, symmetrical, bilateral, hyperintense T2-weighted sequences in the following topographies: basal ganglia, thalamus, *substantia nigra*, red nucleus, brainstem, cerebellar white substance, cerebellar cortex, spinal cord. In addition to the great phenotypic heterogeneity, LS also shows great genetic heterogeneity, and to date, mutations have been described in more than 50 distinct genes responsible to cause the disease.

Keywords: Leigh Syndrome. Mitochondrial encephalopathy. Genetic and neuroimaging changes.

2.1 Introdução

As doenças mitocondriais consistem em vasto grupo de fenótipos clínicos e resultam de mutações ou deleções no DNA mitocondrial (DNAmít) ou no DNA nuclear (DNAn), com consequente prejuízo ao funcionamento da cadeia respiratória (CR) mitocondrial e diminuição na produção de adenosina trifosfato (ATP), levando à falha de energia na célula¹. Constituem a causa mais frequente de doenças metabólicas em humanos, com prevalência de 1:5.000^{1,2}.

Essas doenças geralmente têm caráter multissistêmico, uma vez que as mitocôndrias estão presentes em todas as células do corpo. Inicialmente podem acometer apenas um órgão, mas com a evolução da doença é comum o acometimento progressivo de outros órgãos, principalmente daqueles que são mais dependentes da produção de energia, como sistema nervoso central (SNC), musculoesquelético, coração, sistema endócrino e rins¹.

De acordo com as manifestações da doença em cada indivíduo, é possível reconhecer diversas síndromes clínicas, sendo a síndrome de Leigh (SL) a forma mais comum na infância, cuja incidência estimada é de 1:40.000 nascidos vivos^{3,4,5}. A SL foi descrita pela primeira vez em 1951, por Denis Archibald Leigh, psiquiatra e neuropatologista britânico, na avaliação *post-mortem* de uma criança de sete meses de idade com história de encefalopatia grave e dificuldades respiratórias⁶. Também conhecida como encefalopatia necrotizante subaguda, é uma doença neurodegenerativa devastadora que, tipicamente, manifesta-se na infância, embora existam relatos de casos de manifestação tardia⁷. Apesar de apresentar considerável heterogeneidade clínica e genética, os achados neuropatológicos característicos da SL (lesões bilaterais simétricas de histologia característica com envolvimento do tronco encefálico e/ou núcleos da base) são consistentes⁸.

O objetivo deste trabalho foi realizar revisão da literatura referente a aspectos clínicos, neurorradiológicos e genéticos de pacientes com o diagnóstico de síndrome de Leigh (SL).

2.1.1 Fisiologia mitocondrial

Para melhor entendimento das doenças mitocondriais e sua grande variabilidade, será abordada brevemente a fisiologia mitocondrial. Classicamente, considera-se que a mitocôndria teve sua origem a partir de uma simbiose entre uma célula eucariota e uma bactéria aeróbica. A célula eucariota não tinha habilidade para usar o oxigênio, enquanto a bactéria tinha capacidade de realizar o metabolismo oxidativo. A partir de então, a bactéria evoluiu e deu origem à mitocôndria, o que permitiu o estabelecimento do metabolismo aeróbico muito mais eficaz na produção de energia.

Assim, as mitocôndrias são organelas intracitoplasmáticas de células eucariotas responsáveis por algumas funções vitais, entre elas um conjunto de reações conhecido como fosforilação oxidativa. Alteração da fosforilação oxidativa, via comum final do metabolismo mitocondrial, resulta em uma variedade de manifestações clínicas⁹, por alterar a produção de energia na forma de ATP. A disfunção celular e eventualmente de alguns órgãos pode ocorrer quando o nível de queda de ATP intracelular compromete o funcionamento da célula.

Estruturalmente, a mitocôndria tem quatro compartimentos: a membrana externa, a membrana interna, o espaço intermembrana e a matriz¹⁰. A membrana interna funciona como uma barreira efetiva à difusão iônica, sendo um fator crítico na geração do gradiente de prótons responsável pela fosforilação que ocorre no complexo V da cadeia de transporte de elétrons¹¹.

A matriz mitocondrial contém múltiplas enzimas envolvidas no ciclo do ácido tricarbóxico e na betaoxidação que produzem os doadores de elétrons, dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NADH) e dinucleotídeo de adenina flavina (FADH₂)¹¹. A cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial interna, consiste em cinco complexos proteicos multiméricos: a) complexo I, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) desidrogenase-ubiquinona oxirredutase, com aproximadamente 46 subunidades; b) complexo II, succinato desidrogenase-ubiquinona oxirredutase, com quatro subunidades; c) complexo III, ubiquinona-citocromo c oxirredutase, com 11 subunidades; d) complexo IV, citocromo c oxidase, com 13 subunidades; e) complexo V, ATP sintase, com aproximadamente 16 subunidades.

A cadeia respiratória necessita de dois pequenos carreadores de elétrons: ubiquinona (coenzima Q 10) e citocromo c¹⁰.

A geração de ATP implica a coordenação de dois processos. Em um deles, elétrons são transportados através de complexos até a molécula de oxigênio, com consequente produção de água. Ao mesmo tempo, prótons são bombeados através da membrana mitocondrial interna pelos complexos I, III e IV. A geração de ATP

ocorre devido ao influxo desses prótons de volta à matriz mitocondrial, através do complexo V¹⁰.

A mitocôndria é a única organela da célula, além do núcleo, que possui seu próprio DNA e capacidade de sintetizar ácido ribonucleico (RNA) e proteínas. Apesar de possuir todo esse aparato para seu pleno funcionamento, ela depende também do DNA nuclear.

O DNAmít humano (ilustrado na Figura 1) consiste em uma molécula circular, dupla-fita, 16.596 pares de base, contendo 37 genes. Desses, 24 são necessários para a transcrição do DNAmít, 22 para RNA transportadores e 13 codificam subunidades da cadeia respiratória¹⁰. A maioria dos 900 produtos genéticos na organela são codificados pelo DNA nuclear (DNAn) e importados do citoplasma. Cada mitocôndria apresenta em seu interior múltiplas cópias desse pequeno genoma¹² e, conforme sua demanda energética, esse número pode variar entre 100 e 10.000 cópias por célula¹³.

Os complexos I, III, IV e V, componentes da cadeia respiratória, são produtos de genes derivados tanto do genoma nuclear quanto do mitocondrial. Mais de 85 proteínas estão envolvidas na formação desses complexos, sendo que apenas 13 delas são codificadas pelo DNAmít; o restante é codificado pelo DNA nuclear e importado do citoplasma^{10,11}. As quatro subunidades do complexo II são codificadas no núcleo. Sete das 46 subunidades do complexo I, uma das 11 do complexo III, três das 13 do complexo IV e duas das 13 do complexo V são derivadas do DNAmít¹¹. Dessa forma, mutação em genes, nuclear ou mitocondrial envolvidos na fosforilação oxidativa podem ser a causa de doenças mitocondriais.

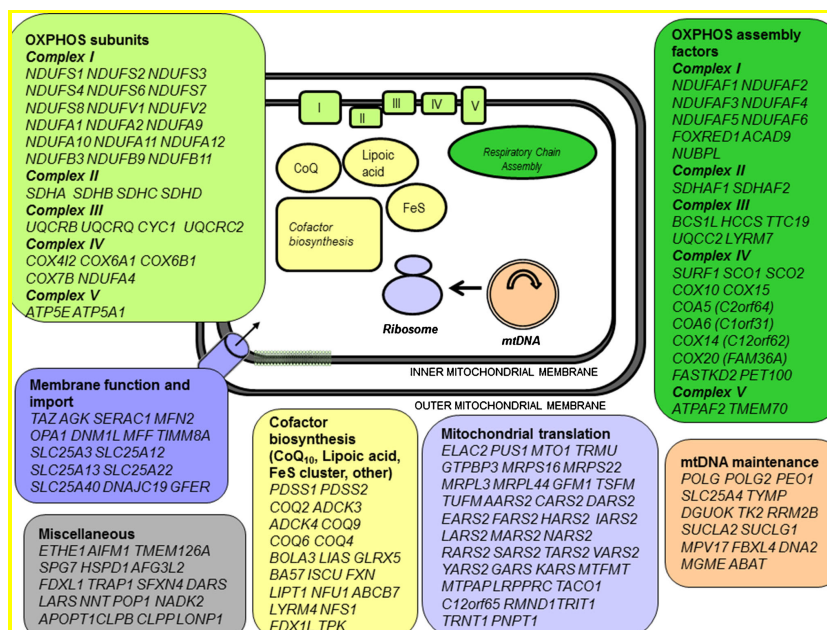


Figura 2 - Complexidade genética das doenças mitocondriais (adaptado de Rahman, 2015)¹⁵.
Fonte: Rahman (2015)¹⁵.

2.2 Critérios diagnósticos da SL

Entre as síndromes mitocondriais destaca-se a síndrome de Leigh devido à sua alta frequência na infância. A seguir descrevem-se os critérios diagnósticos utilizados para se estabelecer o diagnóstico dessa forma de doença mitocondrial.

Rahman *et al.*¹⁵, em 1996, propuseram alguns critérios estritos para o diagnóstico de SL: a) doença neurológica progressiva com atraso do desenvolvimento motor e intelectual; b) sinais e sintomas de doença do tronco encefálico e/ou núcleos da base; c) aumento do lactato sérico e/ou do lactato no liquor; d) um ou mais dos seguintes: i) achados característicos da SL à neuroimagem (hipodensidades simétricas nos núcleos da base à tomografia computadorizada (TC) ou lesões hiperintensas em sequências ponderadas em T2 à ressonância magnética de encéfalo (RME); ii) alterações neuropatológicas típicas *postmortem* ou iii) neuropatologia típica em um irmão com quadro clínico semelhante. Definiram como síndrome de Leigh-like (SLL) aqueles pacientes com fortes achados clínicos, laboratoriais e de imagem, que não podiam ser incluídos nos critérios estritos citados, devido à neuropatologia atípica.

Mais recentemente, Baertling *et al.*⁷, em 2014, propuseram a definição da SL por três aspectos mais comumente descritos e característicos da síndrome: a) doença neurodegenerativa com sintomatologia variável decorrente de; b) disfunção mitocondrial causada por defeito genético hereditário, acompanhado por; c) lesões bilaterais no SNC (que podem ocorrer em uma ou mais áreas do SNC) (Quadro 1).

Quadro 1 - Passos para o diagnóstico da SL (adaptado de Baertling, 2012)⁷

<p>1- História médica</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Consanguinidade parental, casos semelhantes na família, abortos recorrentes 2. Manifestação da doença/deterioração neurológica após período de estresse metabólico (exemplos: infecções, jejum prolongado, cirurgias, etc.) 3. Regressão psicomotora/perda das habilidades adquiridas 4. Exclusão de diagnósticos diferenciais (asfixia perinatal, Kernicterus, intoxicação por monóxido de carbono ou metanol, deficiência de tiamina, doença de Wilson, doença dos gânglios basais responsiva à biotina, encefalites, etc.)
<p>2- Exame físico</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sintomas sugestivos de disfunção dos gânglios basais ou tronco (distonia, nistagmo, disfunção autonômica, etc.) 2. Achados específicos (surdez neurosensorial, hipertricosose, etc.)
<p>3- Parâmetros laboratoriais</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Acidose/acidemia láctica 2. Aminoácidos plasmáticos (hiperalaninemia) 3. Ácidos orgânicos na urina (piruvato, lactato, intermediários do ciclo do ácido cítrico, ácido 3-metilglutacônico, ácido etilmalônico) 4. Painel de carnitina 5. Painel laboratorial geral (parâmetros hepáticos/renais, creatinoquinase, nível de amônia, etc.) 6. Parâmetros metabólicos sugestivos de outra doença metabólica?
<p>4- Ressonância magnética do encéfalo/espectroscopia</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Lesões simétricas sugestivas da SL (gânglios basais, tronco encefálico) 2. Pico de lactato à espectroscopia 3. Achados adicionais; indicações para diagnóstico diferencial?
<p>5- Avaliação dos achados e análise genética primária</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Se a constelação dos achados é sugestiva de um defeito genético específico (exemplo: SUCLA, SERAC1, SURF1)
<p>6- Cultura de fibroblasto e/ou biópsia muscular</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. Avaliação crítica dos sintomas e achados. Evidência forte o suficiente para procedimento invasivo? 3. Procedendo apenas com a biópsia de pele: crianças abaixo de 3 meses de idade, suspeita de deficiência do complexo da piruvato desidrogenase, dificuldades anestésicas/condição clínica crítica 4. Procedendo à biópsia de pele e biópsia muscular: em casos obscuros em pacientes idealmente acima de 3 meses de idade; suspeita de mutação no DNA mitocondrial
<p>7- Reavaliação dos achados e diagnósticos genéticos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Screening</i> do DNA mitocondrial se o defeito da fosforilação oxidativa parecer tecido específico; mutação do gene POLG deve ser levada em conta 2. <i>Screening</i> de um gene nuclear candidato se o defeito da fosforilação oxidativa parecer ubíquo 3. O sequenciamento de todo o exoma pode ser considerado em casos obscuros

2.3 Quadro clínico

As principais manifestações da SL no SNC incluem atraso ou regressão do desenvolvimento psicomotor, nistagmo, oftalmoparesia, atrofia óptica, ataxia,

paralisia de nervos cranianos, fraqueza generalizada, distonia, hipotonia, disfagia e alterações respiratórias⁷. Alguns pacientes têm acometimento do sistema nervoso periférico, que se manifesta como miopatia ou polineuropatia³.

Menos comumente, a SL pode apresentar pouco acometimento neurológico e acometer diversos outros órgãos e sistemas, sendo as principais manifestações não neurológicas: hipertricose, *failure to thrive*, cardiomiopatia (hipertrófica ou dilatada), vômitos, diarreia³.

Em relação à evolução, trata-se de uma doença que se manifesta, mais frequentemente, no período neonatal ou na infância, geralmente nos dois primeiros anos de vida, após um período inicial de desenvolvimento normal, seguida por rápida deterioração clínica, com óbito por volta de três anos de idade^{7,8,16,17}. Em estudo englobando 65 pacientes com o diagnóstico de SL, o aparecimento dos sintomas foi ao nascimento em 15% dos casos; por volta de um mês de vida, em 75% dos casos; e após um mês, em 9% dos casos, enfatizando o aparecimento precoce dos sintomas na maioria absoluta dos casos³. Definiu-se a idade de dois anos como o corte entre manifestação precoce e manifestação tardia da SL¹⁶.

O aparecimento da doença geralmente é desencadeado por insultos metabólicos, como as infecções, jejum prolongado, cirurgias, entre outros. Raramente os primeiros sintomas aparecem na idade adulta e, nesses casos, geralmente há predominância de achados extrapiramidais, progressão lenta da doença e deterioração aguda, mas apresentações atípicas também são descritas¹⁶.

A maioria dos pacientes apresenta as primeiras manifestações da doença no SNC e no sistema nervoso periférico (SNP), sem acometimento dos outros órgãos³. Mas com a evolução da doença é comum o acometimento progressivo de outros órgãos, uma vez que as mitocôndrias estão presentes em todas as células do corpo; os órgãos mais frequentemente acometidos são aqueles mais dependentes da produção de energia¹.

Sofou *et al.*, em 2014, realizaram estudo multicêntrico no qual foram incluídos 130 pacientes com SL, com predomínio de pacientes do sexo masculino (78 do sexo masculino e 52 do sexo feminino). Observou-se que a idade média de aparecimento

dos sintomas foi sete meses, sendo que aos dois anos 80,8% dos pacientes já haviam apresentado algum sinal da doença. A manifestação clínica inicial mais comum foi alteração motora (82,8% dos pacientes), seguida por alterações oculares (25%), dificuldades de alimentação/sucção (14,1%), crises epiléticas (13,3%) e *failure to thrive* (10,2%). Entre as manifestações motoras, hipotonia foi o achado mais comum (presente em 74,6% dos pacientes), seguida por alteração dos reflexos tendíneos (47,7%) e distonia (44,6%). Além de ser o achado motor mais comum, a hipotonia também foi o sinal inicial mais frequente entre os pacientes (59,2%).

O segundo sinal mais comum à apresentação foi alteração dos reflexos tendíneos (14,6%); e o terceiro, ataxia (12,3%). Distonia, espasticidade, hipertonia e coreoatetose foram menos frequentes à apresentação, mas apareceram durante o curso da doença. Alterações oculares foram encontradas em 60,8% dos pacientes, sendo o nistagmo a mais prevalente (23,8%). Crises epiléticas foram relatadas em 51 pacientes (39,2%), sendo as crises generalizadas as mais prevalentes (22,3%). Dos pacientes, 16 não apresentaram adequada resposta ao tratamento antiepilético. Disfunção respiratória foi encontrada em 37,7% dos pacientes e a forma de apresentação mais prevalente foi hiperventilação e/ou padrão respiratório anormal (20%); em segundo lugar, apneia (16,1%).

Disfunção cardíaca estava presente em 17,7% dos pacientes, sendo que mais da metade destes tinha miocardiopatia hipertrófica (9,2%). Dificuldade de alimentação foi descrita em 45,4%, com necessidade de gastrostomia em 33%. Retardo mental, em graus variados, foi registrado em 36,9% dos pacientes. Disfunção gastrointestinal com diferentes formas de apresentação que variaram entre vômito, diarreia, constipação, gastrite e megacólon foi referida em 11,5% dos doentes¹⁶.

Em outro estudo, em 2007, foram avaliados 124 pacientes com o diagnóstico de SL/SLL. A maioria (79,8%) exibiu os primeiros sinais e sintomas da doença no primeiro ano de vida. Alterações de movimento foram o achado mais comum (99,2%), manifestando-se principalmente por meio de fraqueza muscular (41,9%) e hipotonia (41,9%). Nistagmo foi descrito em 15 pacientes (12,1%). Apenas 4,8% tiveram crises epiléticas¹⁸. Disfunção respiratória foi vista em 46,6% dos casos¹⁸,

revelando a grande variabilidade de manifestações clínicas da SL, com diferentes taxas de acometimento nos estudos realizados.

Ressalta-se que a SL, apesar de ser considerada uma forma de doença mitocondrial com envolvimento predominante do SNC e SNP, também cursa com manifestações em outros órgãos, assim como outras formas de doença mitocondrial, sendo imprescindível acompanhamento clínico global.

2.4 Propedêutica

2.4.1 Achados laboratoriais

Na abordagem diagnóstica inicial de pacientes com suspeita de doenças mitocondriais utilizam-se exames que possam revelar disfunção da cadeia respiratória mitocondrial tais como a gasometria arterial, a dosagem de lactato e de piruvato sérico, a dosagem de aminoácidos no sangue e de ácidos orgânicos na urina. A gasometria arterial pode revelar acidose metabólica; o lactato, o piruvato e a sua relação (L/P), geralmente, encontram-se aumentados tanto no sangue como no liquor (líquido cefalorraquidiano - LCR). No entanto, ressalta-se que vários fatores podem interferir nos resultados desses exames, como: problemas na coleta, sendo mais indicada a coleta arterial; o momento da coleta, com descrição de que a coleta pós-prandial pode ser mais adequada para a detecção do aumento de lactato em pacientes com suspeita de doença mitocondrial. Além disso, podem ocorrer oscilações nos valores desses exames em um mesmo indivíduo de acordo com o tempo de evolução da doença ou com momentos de estresse (ex: infecção), que podem levar a maior descontrole metabólico⁷. Assim, a positividade desses exames pode variar entre os diferentes trabalhos.

Na dosagem de aminoácidos no sangue pode-se encontrar aumento de alanina. Por outro lado, a hipocitrulinemia tem sido associada à mutação do DNAm^{it} 8993T>G. A dosagem de ácidos orgânicos na urina pode revelar eliminação de metabólitos do ciclo de Krebs, achado que sugere disfunção mitocondrial.

Mais recentemente, tem sido descrita certa relação entre o padrão ácidos orgânicos eliminados na urina e mutações em genes específicos relacionados a SL/SLL. Em pacientes com SL causada por mutações no gene SUCLA e SUCLG1, que levam à deficiência da enzima succinil-CoA sintetase do ciclo do ácido cítrico, pode-se observar a eliminação de ácido metilmalônico. Em pacientes com SL e mutações no gene SERAC1 há descrição de ácido metilglutacônico na urina.

De forma geral, todos esses exames de triagem citados são pouco sensíveis e pouco específicos e podem variar durante o curso da doença, sendo mais comumente alterados em vigência de fatores estressores (infecções, jejum prolongado, etc.). No entanto, recentemente, em 2011, foi realizado estudo retrospectivo que indicou o aumento da expressão de fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF-21) como útil biomarcador circulante da manifestação muscular de doenças mitocondriais, com sensibilidade muito superior à de outros clássicos indicadores, como lactato, piruvato e relação lactato/piruvato¹⁹.

Acredita-se que a sinalização por meio do FGF-21 seja uma resposta adaptativa à redução energética, resultando em diversas alterações metabólicas, incluindo aumentos na função mitocondrial, na biogênese e no metabolismo energético. Dessa forma, é possível que esse estado de redução energética causado pelas doenças mitocondriais possa induzir o aumento da expressão do FGF-21, em um esforço contra a deficiência metabólica subjacente, sendo, assim, um biomarcador útil. O FGF-21 foi dosado por método ELISA em 54 pacientes com doença mitocondrial (confirmada por diagnóstico genético ou histológico)¹⁹, em 20 controles com doença neuromuscular de etiologia não mitocondrial e em 66 controles. Encontrou-se chance de 91% de identificar corretamente um paciente com doença mitocondrial por meio da dosagem do FGF-21 sérico contra 56, 76, 62 e 71% pela dosagem da creatinoquinase (CK), do lactato, do piruvato e do índice lactato/piruvato, respectivamente. Encontrou-se, ainda, correlação positiva entre o grau de fraqueza muscular e a concentração sérica de FGF-21²⁰.

Em conclusão, o FGF-21 pode ser um método promissor, rápido, não invasivo, sensível e um marcador precoce para o diagnóstico de doenças mitocondriais. Assim, poderá ser utilizado como uma ferramenta para estratificar pacientes para

subsequentes investigações, como biópsia muscular ou sequenciamento de nova geração, a fim de confirmar o defeito bioquímico e genético da doença mitocondrial¹⁹.

Considerando-se que o tecido muscular é rico em mitocôndrias, a dosagem de CK e a biópsia muscular também podem ser úteis no diagnóstico dessas doenças. De forma geral, a dosagem de CK encontra-se normal ou levemente aumentada. Quanto à biópsia muscular, ressalta-se que deve ser realizada em centros de referência onde cuidados específicos são dispensados desde a coleta do tecido muscular, o processamento até a análise do mesmo. O fragmento muscular deve ser congelado em nitrogênio líquido imediatamente após sua retirada, a fim de preservar as enzimas musculares, permitindo a realização de reações histoquímicas e do estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial. Além disso, um pequeno fragmento de músculo deve ser reservado e incluído em glutaraldeído para estudo por microscopia eletrônica. Entre as reações histoquímicas destacam-se as reações Succinato desidrogenase (SDH), Citocromo C oxidase (COX) e a combo SDH/COX, que permitem analisar diretamente a atividades dessas enzimas mitocondriais presentes, respectivamente, no complexo II e no complexo IV.

A biópsia muscular em pacientes com SL pode apresentar-se normal, pouco alterada ou até mesmo marcadamente alterada, dependendo do grau de envolvimento do tecido muscular. As fibras vermelhas rasgadas raramente são descritas e outras alterações possíveis são acúmulo subsarcolemal de mitocôndrias, número reduzido de fibras tipo I, aumento da variabilidade do tamanho das fibras, além de acúmulo discreto de lípidos e glicogênio em algumas fibras musculares³.

Em pacientes com deficiência do complexo I, que correspondem até a 1/3 dos casos de SL, geralmente não são encontradas fibras vermelhas rasgadas e deficiência de COX. Em pacientes com mutação do SURF1 (gene associado ao complexo IV), a atividade da COX encontra-se difusamente reduzida ou até mesmo ausente. Os defeitos específicos do complexo II e IV já podem ser detectados no estudo histoquímico muscular. Alguns dos achados possíveis em biópsia muscular de pacientes com SL podem ser visibilizados na Figura 3²¹.

O estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial (EBCR) assume mais importância, pois meio dele se pode identificar a disfunção de cada complexo isoladamente ou de vários complexos de forma combinada. Apesar de mostrar-se superior, o EBCR também pode ser inconclusivo, quando o grau de comprometimento do tecido muscular é menor ou em fase muito inicial da doença. O EBCR também pode ser feito em fibroblasto.

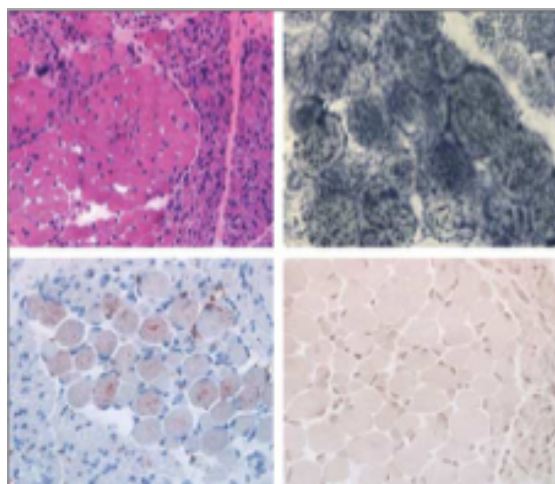


Figura 3 - Biópsia muscular.

A: padrão neurogênico evidenciado na coloração por hematoxilina-eosina (aumento de 10x). B: proliferação mitocondrial revelada pela reação de succinato desidrogenase (aumento de 40x). C: algumas fibras hipertróficas com moderado excesso de lipídeos demonstrados pela coloração *red Oil* (aumento de 20x). D: histoquímica citocromo C oxidase, mostrando ausência de atividade em todas as fibras (aumento de 20x).

Fonte: Gurgel-Giannetti *et al.* (2013)²¹.

2.4.2 Achados de neuroimagem

Além das características clínicas, bioquímicas e histopatológicas musculares, a avaliação da neuroimagem é de grande valor para o diagnóstico do envolvimento do SNC nas doenças mitocondriais. A tomografia computadorizada de crânio (TCC) é útil da detecção de atrofia focal ou difusa, calcificações, edema cerebral e malformações. A ressonância magnética de encéfalo (RME) estrutural e funcional com seus diversos métodos de imagem (espectroscopia, imagens ponderadas em difusão, entre outros) ajudou a aumentar o conhecimento em relação às doenças mitocondriais ao permitir o diagnóstico de alterações anatômicas, metabólicas e hemodinâmicas do cérebro²². Na SL, a TCC pode revelar acometimento bilateral do

putâmen ou do globo pálido e atrofia cortical e subcortical, porém tais achados são mais bem visualizados à RME.

Os achados mais característicos da SL à RME são lesões focais, simétricas, bilaterais, hiperintensas em sequências ponderadas em T2 nas seguintes topografias: gânglios basais, tálamos, substância negra, núcleo rubro, tronco encefálico, substância branca cerebelar, córtex cerebelar, medula espinhal (vide Figura 4). Infartos uni ou multifocais podem estar presentes assim como atrofia cortical focal ou difusa, inclusive cerebelar. Geralmente os gânglios basais são afetados mais precocemente que o tronco encefálico, e envolvimento da substância branca cerebral usualmente ocorre em fases avançadas da doença, achado mais frequente em pacientes com deficiência de COX. A maioria dos estudos encontra forte correlação entre o desenvolvimento de lesões na porção inferior do tronco encefálico e a necessidade de ventilação mecânica ou mesmo morte súbita^{3,7}.

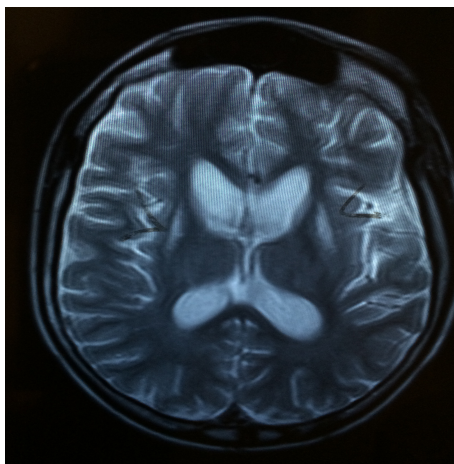


Figura 4 - Alteração de sinal em gânglios da base típica da SL à RME.
Fonte: da autora.

Além da ressonância magnética convencional, pode-se realizar o estudo do SNC com o uso da espectroscopia, que revela o pico de lactato no parênquima cerebral e/ou no liquor como uma das alterações características das doenças mitocondriais. A detecção do aumento do lactato por meio da espectroscopia parece ser mais sensível do que a detecção no plasma, embora em alguns casos possa existir um aumento, mas inferior ao mínimo detectável pelo método⁷.

Existem algumas tentativas de correlações entre padrões de alterações à RME e determinadas mutações. Em 2011, autores relataram que pacientes com deficiência do complexo I apresentaram um padrão comum de alterações à RME: lesões bilaterais e simétricas no tronco encefálico, pelo menos uma anomalia do *estriatum*, além de maior frequência de detecção pico de lactato do que em outras alterações da fosforilação oxidativa²³. Também, o envolvimento da substância branca cerebral, semelhante ao da leucodistrofia, foi visto em alguns pacientes com deficiência de COX²⁴. Estudo realizado em 2013 sugeriu que, em caso de degeneração olivar hipertrófica e sinais clínicos que corroborem o diagnóstico de SL, deve-se pesquisar mutações associadas ao gene SURF1 (deficiência do complexo IV)²⁵.

Em 2014, em estudo retrospectivo em um hospital na Índia, foram avaliadas, de 2005 a 2012, 125 crianças (média de idade 7.6 +/- 5 anos) que apresentavam diagnóstico de doenças metabólicas ou genéticas. Entre essas crianças havia 25 com o diagnóstico de SL ou SLL; 25 tinham diagnóstico de doença mitocondrial que não a SL ou a SLL; e as demais 75 tinham o diagnóstico de outras doenças metabólicas ou genéticas, incluindo doença de Wilson, acidúria glutárica tipo I, doença do xarope de bordo, entre outras. Do total das 125 crianças cujas RMEs foram revistas, 10 tinham degeneração olivar hipertrófica, caracterizada por áreas de aumento da intensidade do sinal nas sequências ponderadas em T2 e *fluid attenuated inversion recovery* (FLAIR); na sequência ponderada em T1 o sinal foi isointenso na região dos núcleos olivares. Os núcleos olivares exibiam forma arredondada em todos os pacientes, com perda da aparência serrilhada. Todos os pacientes com hipertrofia olivar inferior tinham o diagnóstico de SL ou SLL. Dos 25 pacientes com diagnóstico de SL ou SLL, em cinco verificou-se o diagnóstico secundário à mutação do gene SURF1 e em todos eles se constatou hipertrofia olivar inferior.

Esses resultados sugeriram que a degeneração olivar hipertrófica é mais comumente associada a doenças mitocondriais na infância, especialmente SL e SLL. Nessa coorte a degeneração olivar hipertrófica foi encontrada em 40% das crianças com o diagnóstico de SL ou SLL e não foram observadas no outro grupo de desordens metabólicas. Outros pacientes com o diagnóstico de SL, mas sem a

mutação do gene SURF1, também manifestaram a alteração, indicando que não é alteração exclusiva dessa mutação²⁶.

Segundo van der Knapp²⁷, alguns padrões de alteração na substância branca estão mais relacionados a cada defeito básico da CR. Os pacientes com deficiência isolada do complexo I podem relatar extensa leucoencefalopatia cerebral, com edema da substância branca anormal na fase inicial, evoluindo para degeneração macrocística. O corpo caloso geralmente está envolvido, mais frequentemente em sua porção posterior. Pode haver alteração de sinal no córtex cerebral ou cerebelar, com atrofia na evolução. Na deficiência do complexo II a substância branca cerebral pode estar extensamente acometida na presença ou ausência de acometimento dos núcleos da base e do tálamo. O corpo caloso pode estar envolvido, principalmente em sua porção posterior. Na deficiência do complexo IV pode haver leucoencefalopatia difusa ou menos extensa da substância branca cerebral, que pode conter pequenos cistos. Já na SL relacionada à mutação no gene mitocondrial, que codifica a subunidade 6 da ATP sintetase (complexo V), não se descreveu leucoencefalopatia²⁷. Alteração difusa da substância branca supratentorial pode ser vista na Figura 5.

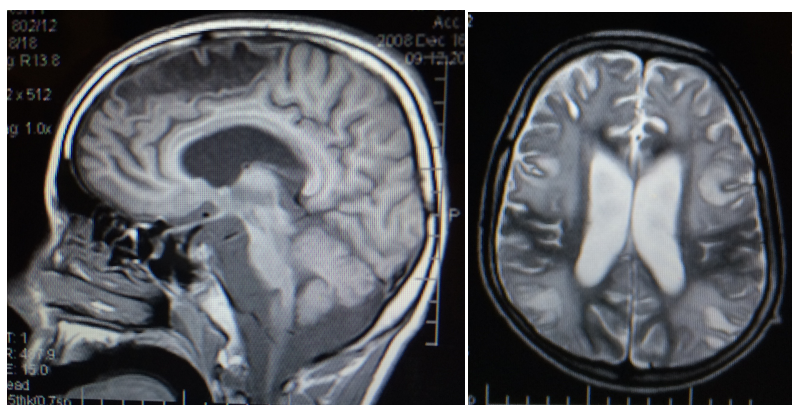


Figura 5: Extenso acometimento de substância branca supratentorial em paciente com SL, com formação de lesões císticas.

Fonte: da autora.

Em 2014, pesquisa sugeriu uma tentativa de estabelecer “fenótipos de neuroimagem” a partir da avaliação do acometimento dos núcleos subtalâmicos, com o objetivo de auxiliar na identificação de determinadas doenças, entre elas a SL²⁸. Na deficiência de COX, relacionada principalmente às mutações no gene SURF1, esses autores encontraram que comumente se observa envolvimento

bilateral dos núcleos subtalâmicos com aumento de sinal nas sequências ponderadas em T2 e FLAIR. É frequente o envolvimento do núcleo olivar inferior, núcleo do trato solitário, pedúnculo cerebelar inferior, trato tegmentar central, formação reticular na ponte dorsal e substância cinzenta periaquedutal. Envolvimento da substância negra, núcleo rubro e núcleo dentado são menos comuns. O envolvimento bilateral dos núcleos subtalâmicos também é comum na deficiência do complexo I e é mais frequentemente observado em pacientes que apresentaram mutação no DNAmit em relação àqueles com mutação no DNAn, segundo a experiência desses autores. O envolvimento dos núcleos subtalâmicos foi relatado em pacientes com deficiência do complexo I devido à mutação nos seguintes genes: MTDN1, MTDN3, MTDN5 e MTDN6. Os achados incluem lesões com sinal hipointenso na sequência ponderada em T1 e hiperintenso nas sequências ponderadas em T2 e FLAIR nas seguintes topografias: substância negra, substância cinzenta periaquedutal, tratos mamilotalâmico e espinotalâmico, lemnisco medial e fascículo longitudinal medial. Anormalidades de sinal no putâmen, caudado, pálido e núcleo dentado também são frequentes.

Nas doenças mitocondriais que se manifestam precocemente na infância, os achados característicos à neuroimagem podem estar ausentes ou não serem específicos, dependendo do momento em que o exame foi realizado e, por esse motivo, novos exames de imagem devem ser realizados no seguimento de um paciente com suspeita de doença mitocondrial, quando a primeira RME for normal²². Sempre que possível, devem ser feitas a avaliação por espectroscopia e também imagem ponderada em difusão. Especificamente sobre a SL, o autor afirma que a relação entre a extensão e progressão dessas lesões com progressão da doença permanece contraditória. As alterações de neuroimagem podem diminuir ou até mesmo desaparecer em ressonâncias de seguimento.

Embora se tente fazer uma correlação entre os achados à neuroimagem e o defeito genético correspondente, resultados de diferentes estudos não refereciam evidências que permitam tal correlação até o momento²⁹.

2.5 Aspectos genéticos

Tendo-se que a mitocôndria tem seu próprio DNA, mas também depende da informação genética presente em genes nucleares, entende-se que as doenças mitocondriais podem ser decorrentes de mutações envolvendo tanto genes mitocondriais como nucleares. E, portanto, têm diferentes formas de herança, que podem ser maternas (DNA mitocondrial) ou mendelianas (autossômica dominante, recessiva e ligada ao cromossomo X).

A genética mitocondrial difere da mendeliana em três principais aspectos: herança materna, heteroplasmia e segregação mitótica. Como regra geral, todas as mitocôndrias do zigoto derivam do óvulo e, por isso, uma mãe com mutação no DNAmít transmitirá a mutação a todos os seus filhos (sejam homens ou mulheres), mas só suas filhas poderão transmitir a mutação futuramente. Cada célula contém milhões de moléculas de DNAmít, algumas com mutação outras sem alterações, condição conhecida como heteroplasmia. Para que ocorra disfunção oxidativa e os sinais clínicos tornem-se evidentes, deve estar presente um número mínimo de DNA mutante, o que é conhecido como “efeito limiar” ou “*threshold*”¹³. Esse “efeito limiar” é menor em tecidos altamente dependentes do metabolismo oxidativo como o cérebro, o coração, a musculatura esquelética, a retina, os rins e as glândulas endócrinas.

A distribuição randômica das organelas durante a divisão celular pode alterar a proporção de DNAmít mutante em cada célula filha. Dessa forma, em algum momento, o “efeito limiar” pode ser alcançado, ocasionando mudança no fenótipo¹⁰. Geralmente, as manifestações clínicas só ocorrem quando há grande quantidade de DNA mutado, tipicamente superior a 90%. Um exemplo é o gene da ATPase 6, cuja mutação mais frequentemente descrita é a 8993T>G, que se manifesta clinicamente apenas quando o nível do DNA mutado ultrapassa o índice de 90%^{3,13}.

Não há relação estreita entre o local da mutação e o fenótipo, sendo que a mesma mutação pode cursar com síndromes clínicas diferentes. O contrário também ocorre: mutações em genes diferentes podem causar a mesma síndrome clínica¹⁰, como demonstrado na Figura 6. Estudo de 1996 também não encontrou associação

mitocondriais, causadas por mutações específicas no DNAmít. Por outro lado, destaca-se que essa estratégia pode não ser a mais adequada, pois os achados clínicos não são muito específicos e o número de genes candidatos é muito grande. Nos últimos anos, grandes avanços ocorreram nas técnicas aplicadas à biologia molecular, culminando com o surgimento do sequenciamento de nova geração (SNG). Essa metodologia apresenta muitas vantagens em relação às outras previamente utilizadas, uma vez que permite aumento da velocidade e redução do preço da análise ampliada do genoma humano. A partir deste método tornou-se possível o sequenciamento simultâneo de diversos genes, que vem sendo aplicado na construção de painéis para doenças com grande heterogeneidade genética, bem como permitiu em um só experimento sequenciar todo o DNA mitocondrial.

Mais recentemente, o SNG passou a ser utilizado para avaliar todas as regiões codificadoras (éxons) do genoma humano, estudo este que é descrito como exoma. O exoma tem se mostrado uma ferramenta poderosa para identificar defeitos genéticos em doenças mendelianas, permitindo a triagem de mutações em genes já conhecidos, mas também em genes ainda não relacionados a doenças humanas. Assim, atualmente um passo importante na avaliação de pacientes com possíveis mutações de ponto do DNA mitocondrial tem sido o sequenciamento completo do DNAmít^{7,32,33}. Ressalta-se que o DNAmít deve ser preferencialmente obtido de tecidos afetados, usualmente o músculo, onde a porcentagem de heteroplasmia da presumida mutação do DNAmít é suficientemente alta para ser detectada.

Caso sejam excluídas as mutações do DNAmít, o próximo passo é selecionar genes nucleares candidatos de acordo com o quadro clínico, achados histopatológicos e bioquímicos. A estratégia é sequenciar os genes mais frequentemente mutados entre os possíveis candidatos, porém em alguns casos pode-se chegar a 60, 70, tornando essa pesquisa de genes específicos muito longa e onerosa. Assim, também para o estudo de mutações em genes nucleares tem-se aplicado a técnica de SNG, na forma de painéis, com número fixo de genes previamente selecionados ou a partir do estudo de todo o exoma. No último caso destaca-se a possibilidade de avaliar todos os genes já relacionados às doenças mitocondriais bem como novos genes^{7,32}.

Até o momento já foram identificadas mutações em mais de 50 genes no DNA nuclear e DNA mitocondrial responsáveis por causar SL, sendo que algumas estão mais frequentemente associadas à doença⁸. No DNA mitocondrial destacam-se os genes RNA transportadores da leucina (3243), valina (1644), triptofano e lisina (8344) e gene ATPase 6 (8993), genes do complexo I, complexo IV e complexo V. Entre os principais genes nucleares que se associam ao fenótipo de SL citam-se diferentes genes associados a proteínas dos diferentes complexos da cadeia respiratória, bem como genes associados a fatores de translação e biossíntese da CoQ10, entre outros (Quadros 2 e 3).

Quadro 2- Mutações em genes mitocondriais responsáveis por causar SL por meio de herança materna

Mutação	Gene
3460G>A	ND1
4681T>C	ND2
10158T>C	ND3
10191T>C	ND3
10197G>A	ND3
11984T>C	ND4
12706T>G	ND5
12706T>C	ND5
13511A>T	ND5
13513G>A	ND5
13514A>G	ND5
14459G>A	ND6
14484T>C	ND6
14487T>C	ND6
14600G>A	ND6
9537Cins	COXIII
9547G>A	COXIII
8993T>C	ATPase 6
8993T>G	ATPase 6
9176T>C	ATPase 6
9176T>G	ATPase6
9185T>C	ATPase6
1644G>T	tRNA(Val)
8344A>G	tRNA(Lys)
3537Tins	tRNA(Trp)
3243A>G	tRNA(Leu)
8663G>A	tRNA(Lys)

ND, COX e ATP: genes mitocondriais codificadores de subunidades dos complexos I, IV e V da cadeia respiratória; tRNA: gene mitocondrial codificador de RNA transportador.

Fonte: adaptado de Finsterer (2008)³.

Quadro 3- Mutações em genes do genoma nuclear (DNAn) causando SL ou SLL

Local	Gene
Complexo I	NDUFS1
	NDUFV1
	NDUFV2
	NDUFS1,NDUFV1
	NDUFS2
	NUDFS3
	NDUFS4
	NDUFS4(AQDQ)
	NDUFS7
	NDUFS8
Complexo II	SDHA
	SDH
Complexo IV	COX15
	SURF1
Coenzima Q 10	CoQ10
	PDSS2
Complexo da piruvato desidrogenase	PDHc
	PDHX1
Outros	EFG1
	EFTu
	LRP130
	SUCLA2
	BDT

BDT: biotinidase; CoQ10: coenzima Q10; EFG1 e EFTu: fatores de tradução de alojamento G1 e Tu; LRP130: proteína rica em leucina 130; NDUFS, NDUFV, SDH, COX, SURF: genes nucleares codificadores de subunidades dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória; SUCLA2: succinato coenzima A ligase A2.

Fonte: adaptado de Finsterer (2008)³.

Ressalta-se que pacientes com o mesmo defeito genético podem manifestar a doença em idades diferentes, mais precocemente ou mais tardiamente, e ainda com diferentes manifestações clínicas. Isso sugere que o fenótipo da SL é mais influenciado pelo grau de acometimento da produção energética em determinadas regiões cerebrais do que pelo gene específico envolvido¹⁷.

2.6 Diagnóstico diferencial

Diversas doenças podem mimetizar a SL, mas é possível diferenciá-las com base na anamnese bem detalhada e achados laboratoriais característicos.

No período neonatal, dois importantes diagnósticos diferenciais são asfixia perinatal e *kernicterus*, que podem cursar com alterações de neuroimagem em topografias usualmente acometidas na SL⁷.

A encefalopatia de Wernicke, causada pela deficiência de tiamina, pode afetar crianças e adultos e também cursa com alterações à RME em topografias semelhantes às acometidas na SL⁷.

Acidemia metilmalônica, acidemia propiônica e acidúria glutárica tipo I podem apresentar acometimento simétrico dos gânglios da base, mas mostram achados laboratoriais diferentes das doenças mitocondriais⁷.

Outra doença que pode cursar com acometimento simétrico dos gânglios da base, tronco encefálico e córtex é a doença dos gânglios basais responsiva à biotina (BBGD) causada por mutação no gene SLC19A3, que codifica um transportador da tiamina. Quando não tratada, pode cursar com grave quadro neurológico e levar a óbito. O tratamento com biotina e tiamina pode conduzir à melhora clínica e radiológica expressivas e deve ser tentado em todos os pacientes com suspeita de SL⁷.

2.7 Tratamento

Devido ao fato de ser uma doença rara e de difícil diagnóstico, não existem estudos controlados e em larga escala que indiquem o uso de algum medicamento em doenças mitocondriais.

Substâncias conhecidas como “nutracêuticas”, por serem extraídas de alimentos regulares, foram propostas como um possível tratamento, embora não exista, até o momento, evidência de melhora clínica com seu uso. Coenzima Q10, L-carnitina, biotina, riboflavina, ácido alfa-lipoico, monidrato de creatina, tiamina - entre outras - são exemplos dessas substâncias. Apresentam propriedades antioxidantes ou agem como cofatores no processo de fosforilação oxidativa. Os tratamentos podem ser feitos com múltiplas combinações dessas substâncias. Alguns casos com o diagnóstico de SL relataram resultados promissores com o uso de coenzima Q10 e seus derivados sintéticos idebenona e EPI-743³⁴, embora os estudos não tenham sido realizados com controles randomizados e de modo duplo-cego. Esses resultados promissores podem decorrer do fato de a deficiência de CoQ10 ser

considerada uma doença mitocondrial tratável a partir da reposição e poder manifestar-se clinicamente como SL.

Em geral, deve-se considerar o uso do “coquetel de vitaminas” em pacientes com o diagnóstico recente de doenças mitocondriais⁷.

2.8 Prognóstico

O prognóstico da SL ainda é precário, com óbito precoce, geralmente antes da idade de cinco anos, devido ao fato de não existir, até o momento, tratamento de cura. Monitorização frequente de distúrbios respiratórios ajuda a prevenir a morte súbita em pacientes com manifestação precoce da doença; em estudo com 65 pacientes com SL, 39% faleceram devido à insuficiência respiratória³.

Estudo multicêntrico, em 2014, relacionou os seguintes fatores como preditores de mau prognóstico: manifestação da doença antes dos seis meses de vida, *failure to thrive*, lesões no tronco encefálico à neuroimagem e internação em unidade de tratamento intensivo¹⁶.

2.9 Conclusão

A SL é a mais comum das doenças mitocondriais da infância e tem ampla variabilidade de apresentação clínica e acentuada heterogeneidade genética. Alguns padrões de manifestações clínicas, laboratoriais e de imagem podem levar à suspeição do defeito genético subjacente, mas ainda não há como estabelecer fortes correlações entre tais dados. Até o momento não existe tratamento de cura disponível, mas a identificação da mutação responsável pela doença em cada paciente é de grande importância, pois pode auxiliar no manejo do quadro, seguimento e até mesmo no prognóstico. O surgimento de novas técnicas de investigação do defeito genético subjacente, como o sequenciamento de nova geração ou mesmo o estudo de todo o exoma, é de grande importância para definição diagnóstica mais precoce, além de possibilitar melhor acompanhamento desses pacientes, aconselhamento genético para essas famílias e tornar desnecessária a realização de procedimentos diagnósticos invasivos.

Referências

- 1- Goldstein AC, Bhatia P, Vento JM. Mitochondrial disease in childhood: nuclear encoded. *Neurotherapeutics*. 2013; 10(2):212-226. Doi:10.1007/s13311-013-0185-6.
- 2- Ardisson A, Lamantea E, Invernizzi F, Zeviani M, Genitrini S, Moroni I, *et al.* Mitochondrial diseases in childhood. *Current Molecular Medicine*. 2014; 14(8):1069-1078.
- 3- Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatrics Neurology*. 2008 Oct; 39(4):223-35. Doi: 10.1016.
- 4- Ronchi D, Cosi A, Tonduti D, Orcesi S, Bordoni A, Fortunato F, *et al.* Clinical and molecular features of an infant patient affected by Leigh disease associated to m.14459G. A mitochondrial DNA mutation: a case report. *BMC Neurology*. 2011; 11:85. Published online 2011 Jul. 12. Doi: 10.1186/1471-2377-11-85.
- 5- Ruhoy IS, Saneto RP. The genetics of Leigh syndrome and its implication for clinical practice and risk management. *Application of Clinical Genetics*. 2014; 7:221-234. Doi:10.2147/TACG.S46176.
- 6- Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal Neurosurgical Psychiatry*. 1951; 14, 216.
- 7- Baertling F, Rodenburg RJ, Schaper J, Smeitink JA, Koopman WJ, Mayatepek E, *et al.* A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *Journal Neurology Neurosurgical Psychiatry*. 2014 Mar; 85(3):257-65. Doi: 10.1136/jnnp-2012-304426.
- 8- Lake NJ, Bird MJ, Isohanni P, Paetau A. Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *Journal Neuropathology & Experimental Neurology*. 2015 Jun; 74(6):482-92. Doi: 10.1097.
- 9 - Di Donato S. Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *Journal Neurology*. 2009. 256: 693-710. Doi: 10.1007/s00415-009-5028-3.
- 10- DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New England Journal Medicine*. 2003; 348:2656-2668. June 26, 2003. Doi: 10.1056.
- 11- Saneto RP, Sedensky MM. Mitochondrial disease in childhood: mtDNA encoded. *Neurotherapeutics*. 2013 Apr; 10(2):199-211. Doi: 10.1007/s13311-012-0167-0.
- 12- Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: Impaired mitochondrial translation in human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014; 48(100):77-84. Doi: 10.1016.
- 13- Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*. 2013; 106(1):135-159. Doi:10.1093/bmb/ldt017.

- 14- Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews Genetics*. 2012; 13(12):878-890. Doi: 10.1038/nrg3275.
- 15- Rahman S. Emerging aspects of treatment in mitochondrial disorders. *Journal Inherited Metabolic Disease*. 2015, May 12. DOI: 10.1007/s10545-015-9855-3.
- 16- Sofou K, De Coo IFM, Isohanni P, Ostergaard E, Naess K, De Meirleir L, *et al*. A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014; 9:52. Doi:10.1186/1750-1172-9-52.
- 17- Rahman S, Block RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, *et al*. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annual Neurologic*. 1996 Mar; 39(3):343-51.
- 18- Zhang Y, Yang YL, Sun F, Cai X, Qian N, Yuan Y, *et al*. Clinical and molecular survey in 124 Chinese patients with Leigh or Leigh-like syndrome. *Journal Inherited Metabolic Disease*. 2007 Apr; 30(2):265. Epub 2007 Feb 24.
- 19- Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, *et al*. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol*. 2011 Sep; 10(9):806-18. Doi: 10.1016/S1474-4422(11)70155-7. Epub 2011 Aug 3.
- 20- Davis RL, Liang C, Edema-Hildebrand F, Riley C, Needham M, Sue CM. Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease. *Neurology*. 2013 Nov 19; 81(21):1819-26. Doi: 10.1212/01.
- 21- Gurgel-Giannetti J, Oliveira G, Brasileiro Filho G, Martins P, Vainzof M, Hirano M. Mitochondrial cardioencephalomyopathy due to a novel SCO2 mutation in a Brazilian patient: case report and literature review. *JAMA Neurology*. 2013 Feb; 70(2):258-61. Doi: 10.1001.
- 22- Sofou K, Steneryd K, Wiklund LM, Tulinius M, Darin N. MRI of the brain in childhood-onset mitochondrial disorders with central nervous system involvement. *Mitochondrion*. 2013 Jul; 13(4):364-71. Doi: 10.1016/j.mito.2013.04.008. Epub 2013 Apr 24.
- 23- Lebre AS, Rio M, Faivre d'Arcier L, Vernerey D, Landrieu P, Slama A, *et al*. A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *Journal Medicine Genetic*. 2011 Jan; 48(1):16-23. Doi: 10.1136/jmg.2010.079624. Epub 2010 Oct. 23.
- 24- Arai J, Tanabe Y. Leigh syndrome: Serial MR imaging and clinical follow-up. *American Journal Neuroradiology*. 2000 Sep.; 21:1502-1509.
- 25- Kinghorn KJ, Kaliakatsos M, Blakely EL, Taylor RW, Rich P, Clarke A, *et al*. Hypertrophic olivary degeneration on magnetic resonance imaging in mitochondrial syndromes associated with POLG and SURF1 mutations. *Journal Neurology*. 2013 Jan; 260(1):3-9. Doi: 10.1007/s00415-012-6564-9.

- 26- Bindu PS, Taly AB, Sonam K, Govindaraju C, Arvinda HR, Gayathri N, *et al.* Bilateral hypertrophic olivary nucleus degeneration on magnetic resonance imaging in children with Leigh and Leigh-like syndrome. *British Journal Radiology*. 2014, 87:20130478.
- 27- van der Knaap MS, Valk J. Síndrome de Leigh e leucoencefalopatia mitocondrial. *In: van der Knaap MS, Valk J. Ressonância magnética da mielinização e dos distúrbios da Mielina*. 3. ed., Rio de Janeiro. Ganabara Koogan. 2008, p. 221-225
- 28- Bosemani T, Anghelescu C, Boltshauser E, Honn Jr AH, Pearl PL, Craiu D, *et al.* Subthalamic nucleus involvement in children: a neuroimaging pattern-recognition approach. *Eur J Paediatr Neurol*. 2014 May; 18(3):249-56. Doi: 10.1016/j.
- 29- Sonam K, Khan NA, Bindu PS, Taly AB, Gayathri N, Bharath MM, *et al.* Clinical and magnetic resonance imaging findings in patients with Leigh syndrome and SURF1 mutations. *Brain & Development*. 2014 Oct; 36(9):807-12. Doi: 10.1016.
- 30- Carozzo R, Piemonte F, Tessa A, Lucioli S, Rizza T, Meschini MC, *et al.* Infantile Mitochondrial disorders. *Bioscience Reports*. 2007; 27:105–112. Doi: 10.1007/s10540-007-9039-y.
- 31- Rotig A. Genetics of mitochondrial respiratory chain deficiencies. *Revue Neurology*. 2014 May; 170(5):309-22. Doi: 10.1016.
- 32- Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J Inher Metab Dis*. 2015 May; 38(3):437-43. Doi: 10.1007/s10545-015-9823-y. Epub 2015 Mar 4.
- 33- Naess K, Freyer C, Bruhn H, Wibom R, Malm G, Nennesmo I, *et al.* MtDNA mutations are a common cause of severe disease phenotypes in children with Leigh syndrome. *Biochemical Biophysical Acta*. 2009 May; 1787(5):484-90. Doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.014.
- 34- Martinelli D, Catteruccia M, Piemonte F, Pastore A, Tozzi G, Dionisi-Vici C, *et al.* EPI-743 reverses the progression of the pediatric mitochondrial disease: genetically defined Leigh Syndrome. *Molecular Genetic Metabolism*. 2012 Nov;107(3):383-8. DOI: 10.1016.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o fenótipo clínico, neurorradiológico e o genótipo de pacientes com síndrome de Leigh (SL) acompanhados nos Ambulatórios de Doenças Neuromusculares e de Doenças Neurogenéticas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar clinicamente os pacientes com SL.
- b) Caracterizar as alterações neurorradiológicas por estudo por ressonância magnética do encéfalo.
- c) Caracterizar os achados histopatológicos musculares e bioquímicos da cadeia respiratória (CR) mitocondrial.
- d) Identificar mutações mais comuns do DNA mitocondrial associada à SL.
- e) Correlacionar fenótipo e genótipo dos pacientes com SL.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo e casuística

Realizou-se estudo de série de casos com amostra não probabilística, envolvendo 18 pacientes com diagnóstico de SL/SLL acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC -UFMG). Os pacientes foram avaliados no período de junho de 2013 a fevereiro 2015.

O diagnóstico de síndrome de Leigh (SL) e síndrome de Leigh-like (SLL) foi estabelecido de acordo com os critérios¹: a) doença neurológica progressiva com atraso do desenvolvimento motor e intelectual; b) sinais e sintomas de doença do tronco encefálico e/ou gânglios da base; c) aumento do lactato sérico e/ou do lactato no liquor; d) um ou mais dos seguintes: i) achados característico da SL à neuroimagem (hipodensidades simétricas nos gânglios da base à TC ou lesões hiperintensas em sequências ponderadas em T2 à RME; ii) alterações neuropatológicas típicas *postmortem*; iii) neuropatologia típica em um irmão com quadro clínico semelhante. Definiram como síndrome de Leigh-like (SLL) aqueles pacientes que apresentavam fortes achados clínicos, laboratoriais e de imagem, mas não podiam ser incluídos nos critérios estritos citados anteriormente, devido à neuropatologia atípica¹.

4.1.1 Critério de inclusão

Foram incluídos todos os pacientes com diagnóstico de SL/SLL acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC UFMG que aceitaram participar do estudo.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos apenas os pacientes que se recusaram a participar.

4.2 Procedimentos

A maioria dos pacientes incluídos nesta pesquisa foi reavaliada clinicamente pelo mesmo neurologista, no período entre junho de 2013 e fevereiro de 2015 e foi preenchido um protocolo elaborado com base em aspectos clínicos relevantes. Não foram reavaliados os pacientes de número 10 (não foi localizado ao telefone e endereço disponíveis) e o de número 18 (evoluiu para óbito em 2009).

A pesquisa foi realizada nas dependências do Hospital das Clínicas da UFMG. A avaliação clínica e a coleta de sangue foram feitas no Ambulatório de Doenças Neuromusculares, no Ambulatório São Vicente.

O estudo histopatológico e molecular foi realizado no Laboratório de Investigações de Doenças Musculares no Departamento de Anatomia Patológica da FM da UFMG, terceiro andar, sala 331.

O estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial e parte do estudo molecular foram realizados no Laboratório do Prof. Michio Hirano na *Columbia University*, em Nova Iorque, como parte do projeto de pós-doutorado da orientadora deste projeto.

4.2.1 Avaliação clínica e exames complementares

Os pacientes foram reavaliados clinicamente por neurologista por meio de anamnese, exame físico e exame neurológico de cada um deles. Foi preenchido um protocolo contendo os dados relevantes da história clínica e do exame neurológico (Apêndice B).

Foram levantados do prontuário dos pacientes os seguintes exames complementares, quando disponíveis: dosagem de lactato sérico, creatinoquinase (CK), eletroneuromiografia (ENMG), gasometria arterial, dosagem de aminoácidos no sangue, dosagem de ácidos orgânicos na urina, ecocardiograma e dados da avaliação oftalmológica e auditiva.

Os irmãos de alguns dos pacientes incluídos na pesquisa também foram avaliados clinicamente, na tentativa de se detectarem manifestações da doença.

4.2.2 Reavaliação da neuroimagem

As ressonâncias magnéticas de encéfalo (RME), realizadas previamente e em variados estabelecimentos, foram reavaliadas por duas neurorradiologistas pediatras, com o conhecimento prévio de que se tratava de exames de pacientes com o diagnóstico de SL/SLL. Por ser uma avaliação retrospectiva de imagens já realizadas, não foi seguido protocolo para a obtenção das imagens. Dessa forma, as imagens foram avaliadas, nas sequências disponíveis, para os seguintes aspectos: atrofia cortical e cerebelar, alteração de sinal no córtex cerebral, na substância branca supratentorial e na substância branca cerebelar, no corpo caloso, nos gânglios da base, nos tálamos, nos núcleos subtalâmicos, no tronco encefálico e no cerebelo. Apenas um paciente realizou RM de medula cervical, que também foi reavaliada. Quando disponível, as sequências ponderadas em difusão e espectroscopia foram reavaliadas.

A reavaliação das imagens pelas duas neurorradiologistas aconteceu simultaneamente e, em caso de discórdia, em relação aos achados, houve consenso para estabelecer o resultado.

4.2.3 Estudo histológico e histoquímico muscular

Este estudo foi efetuado a partir de uma nova análise das lâminas das biópsias musculares estocadas, realizadas por ocasião do diagnóstico.

Em alguns pacientes, os fragmentos de músculo estocados foram utilizados para uma nova confecção de lâminas e melhor análise do estudo histoquímico muscular, mediante a autorização do paciente e/ou responsável. Foram obtidos cortes histológicos de 5 a 8 micrômetros de espessura em aparelho de criostato, fixados em lâminas de vidro. Em seguida, foram realizadas colorações histológicas e reações enzimáticas histoquímicas: hematoxilina-eosina (HE), tricômico de Gomori modificado (GOMORI), ácido periódico de Schiff (PAS) e *Oil Red O* (ORO) e as

reações histoquímicas oxidativas: succinato desidrogenase (SDH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), citocromo C oxidase (COX) e adenosina trifosfatase (ATPases) 9,4 e 4,3.

4.2.4 Estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial

Os resultados do estudo da cadeia respiratória mitocondrial realizado na *Columbia University*, em 2013, de acordo com o protocolo daquela instituição, foram utilizados neste estudo.

4.2.5 Estudo molecular

A) Coleta do sangue e extração do DNA

O estudo molecular utilizou amostras de DNA genômico extraídas a partir da coleta de 10 mL de sangue periférico dos pacientes e de seus familiares, em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A coleta do material foi feita no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG e a extração do DNA genômico foi obtida com base em metodologia rotineira, utilizando-se o *kit* de extração *Wizard Genomic DNA Purifications Kit* – (Promega CAT # A1125).

B) Amplificação do DNA mitocondrial

Para o estudo de mutações do DNA mitocondrial, foram utilizados quatro pares de *primers* (*forward* e *reverse*), que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol Ltda.* Entre estes, foram feitos um par de *primer* para amplificação de fragmento contendo a mutação 1644 T>G (gene tRNA Valina), um par de *primer* para a mutação 3243A>G (gene tRNA leucina), um par de *primer* para a mutação 8344A>G (gene tRNA Lisina), um par de *primer* para as mutações 8993T>G e 8993T>C (gene ATPase 6).

Para o sequenciamento foram desenhados mais três *primers*, conforme descrito no Quadro 1. Para o sequenciamento da mutação do gene tRNA leucina, utilizou-se o mesmo *primer* F usado para realizar reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a amplificação dos fragmentos de DNA mitocondrial, utilizou-se a técnica PCR, com os seguintes ciclos térmicos:

Temperatura de desnaturação: - 94°C, durante 1 minuto.

Seguido por 35 ciclos de: - 94°C, durante 1 minuto.

- Temperatura de *anealing* de cada par de *primer* de acordo com o Quadro 1

- 72°C, durante 30 segundos.

Temperatura de extensão final: - 72°C, durante 30 segundos

Quadro 1 - Informações sobre os *primers*, produto de PCR e temperatura de *anealing*

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do Produto de PCR	Temperatura de <i>Anealing</i>
tRNA VALINA F	5'- TAACCCATACCCCGAACCA-3	1086 pb	55°C
tRNA VALINA R	5'- TTTCATCTTTCCCTTGCGGT- 3		
tRNA VALINA SEQ	5"- ACCCTCCTCAAGTATACTTC -3		
tRNA LEUCINA F	5'- CCAGGTCGGTTTCTATCTAC-3	1461 pb	55°C
tRNA LEUCINA R	5'- TCAGTGCGAGCTTAGCGCTG -3		
tRNA LEUCINA SEQ	5'- CCAGGTCGGTTTCTATCTAC-3		
tRNA LISINA F	5'- AGAACCTCCATAAACCTGG - 3	1129 pb	55°C
tRNA LISINA R	5'- ATGGGCTTTGGTGAGGGAGG - 3		
tRNA LISINA SEQ	5'- AACCAAACCATTTACCGC- 3		
ATP 6 & 8 F	5'- AGCTAACTTAGCATTAACCT - 3	934 pb	56°C
ATP 6 & 8 R	5' – CTATATGATAGGCATGTGAT – 3'		
ATP 6 & 8 SEQ	5'- AGCCCACTTCTTACCACAAG -3		

Fragmentos foram amplificados utilizando-se o *kit* PCR *Master Mix* (Promega CAT # M7502), de acordo com o protocolo:

Para o volume total 25 µL para cada amostra, utilizou-se aproximadamente:

DNA (20 ng) _____ 2,0 µL

Água miliQ _____ 8,5 µL

Primer F (2,0 Mm ou 20 Mm) ____ 1,0 µL

Primer R (2,0 MM ou 20 Mm) ____ 1,0 µL

**Mix* _____ 12,5 µL

*(*Mix* contendo todos os desorribonucleotídeos trifosfatados - dNTPs - e a taq polimerase)

A verificação da amplificação do produto de PCR foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 2 μL de brometo de etídio em cuba horizontal a uma voltagem de cerca de 100 volts.

Depois de verificados os produtos de PCR, estes foram purificados com *kit* de purificação Qiagen (Qiagen CAT#28106) com base em metodologia rotineira, para posterior sequenciamento.

C) Sequenciamento dos fragmentos de DNA mitocondrial

O sequenciamento do produto de PCR foi realizado no sequenciador ABI 373 DNA *Sequencer* (*Applied Biosystem*) de 96 capilares, de acordo com as especificações do fabricante.

O sequenciamento dos produtos de PCR seguiu o seguinte protocolo:

Para o volume total de 10 μL para cada amostra, utilizou-se aproximadamente:

Big Dye _____ 2,0 μL

Primer F ou *R* _____ 2,5 μL

Buffer _____ 1,0 μL

Água miliQ _____ 2,5 μL

Produto de PCR purificado _____ 2,0 μL

Para a reação de sequenciamento do gene, utilizaram-se os seguintes ciclos térmicos em termociclador:

Temperatura de desnaturação: - 96°C, durante 1 minuto.

Seguido por 25 ciclos de: - 96°C, durante 10 segundos.

- 50°C, durante 5 segundos.

- 60°C, durante 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento, os produtos de sequenciamento foram purificados por técnica que utiliza o reagente *sephadex* em placa *multiscreen* de 96 poços para os quais os produtos são transferidos para purificação e novamente transferidos para uma placa de sequenciamento, levados, então, ao sequenciador.

D) Análise do sequenciamento

A análise dos cromatogramas foi feita manualmente, a fim de identificar-se heteroplasmia em pequenas proporções.

4.3 Aspectos éticos

Termos de consentimento pós-informado foram elaborados de acordo com a faixa etária e orientação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP). Os pacientes foram admitidos no estudo após receberem as informações necessárias e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido e a autorização para foto e vídeo.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFMG, sob o número – ETIC 413/04, pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, pela diretoria da FM-UFMG, pelas unidades funcionais onde foram realizados os procedimentos e pelo Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC-UFMG (Anexo A).

REFERÊNCIA

1- Rahman S, Block RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, *et al.* Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annual Neurology*. 1996 Mar; 39(3):343-51.

5 ARTIGO 2 – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, NEURORRADIOLÓGIA E GENÉTICA DOS PACIENTES COM SÍNDROME DE LEIGH/SÍNDROME DE LEIGH-LIKE

(Artigo original)

Resumo

Objetivo: caracterizar os aspectos clínicos, neurorradiológicos e moleculares de pacientes com diagnósticos de síndrome de Leigh (SL) e síndrome de Leigh-like (SLL), acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-UFMG. **Métodos:** realizou-se estudo de uma série de casos composta de 18 pacientes com diagnóstico de SL/SLL. Os pacientes foram reavaliados em relação a aspectos clínicos, laboratoriais, neurorradiológicos e histoquímicos (em biópsia muscular). O estudo molecular consistiu na triagem das mutações do DNA mitocondrial mais frequentemente associadas à SL/SLL (3243A>G; 8344A>G; 8993T>G; 8993T>C; 1644T>G). **Resultados/discussão:** foram incluídos no presente estudo 18 pacientes, de ambos os sexos, com idade média de 16,8 anos. O curso clínico da doença mostrou-se crônico e com baixa taxa de mortalidade, com apenas um óbito documentado. Encontrou-se lactato sérico aumentado assim como acidemia láctica em frequência menor que o descrito na literatura. À biópsia muscular, apenas um paciente apresentou fibras vermelhas rasgadas, e à histoquímica, uma criança relatou deficiência total de citocromo C oxidase que, associado a seus achados clínicos, possibilitou o direcionamento da pesquisa do defeito genético subjacente, identificando-se mutações em heterozigose composta no gene SCO2. O padrão de alteração à ressonância magnética de encéfalo foi bastante variável, mas, em geral, os pacientes tiveram lesões em topografias já descritas na literatura e características da SL. Nenhum deles apresentou as mutações do DNAmít pesquisadas. **Conclusão:** a SL/SLL possui ampla heterogeneidade genética e curso clínico variável tornando-se um desafio a identificação do defeito genético em cada paciente. Na presente casuística não foram encontrados pacientes com as mutações mais comuns do DNA mitocondrial associadas a SL/SLL. Tendo-se que as encefalopatias mitocondriais da infância, incluindo a SL/SLL, são mais frequentemente causadas por genes nucleares, o estudo do exoma por sequenciamento de nova geração é, atualmente, considerado uma ferramenta mais eficaz na investigação desses pacientes.

Palavras-chave: Síndrome de Leigh. Encefalopatia mitocondrial. Alterações à neuroimagem. Alterações genéticas.

Abstract

Objective: To characterize the clinical, neuroradiological and molecular aspects of patients diagnosed with Leigh syndrome (LS) and Leigh-like syndrome (LLS), followed at the Neuromuscular Disease Outpatient Clinic of HC-UFMG. **Methods:** A case series composed of 18 patients with LS/LLS diagnosis was carried out. The patients were reevaluated in relation to clinical, laboratory, neuroradiological and histochemical aspects (in muscle biopsy). The molecular study consisted of screening mitochondrial DNA mutations most frequently associated with LS/LLS (3243A> G; 8344A> G; 8993T> G; 8993T> C; 1644T> G). **Results/Discussion:** We included 18 patients of both sexes in the present study. The average age of the patients was 16.8 years; the clinical course of the disease was chronic and low mortality rate, with only one documented death. Increased serum lactate was found as well as lactic acidemia at a lower frequency than described in the literature. In the muscle biopsy, only 1 patient presented red-stained fibers and histochemistry, a child presented total cytochrome C oxidase deficiency, which, together with his clinical findings, made it possible to search for the underlying genetic defect, identifying mutations in composite heterozygotes in the SCO2 gene. The pattern of alteration to magnetic resonance imaging of the brain was quite variable, but, in general, patients presented lesions in topographies already described in the literature and characteristics of LS. None of the patients had the mtDNA mutations screened. **Conclusion:** LS/LLS presents wide genetic heterogeneity and variable clinical course making it a challenge to identify the genetic defect in each patient. In the present study, no patients were found with the most common mitochondrial DNA mutations associated with LS/LLS. Considering that childhood mitochondrial encephalopathies, including LS/LLS, are most often caused by nuclear genes, the study of new generation sequencing exome is currently considered a more effective method in the investigation of these patients.

Keywords: Leigh syndrome, mitochondrial encephalopathy, neuroimaging changes, genetic changes.

5.1 Introdução

As doenças mitocondriais podem manifestar-se em qualquer idade e com grande variabilidade de sinais e sintomas, além de grande variabilidade genética. Ocorrem em consequência de mutações no DNA mitocondrial (DNAmit) ou no DNA nuclear (DNAn), com prejuízo no funcionamento da cadeia respiratória e diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP). São a causa mais frequente de doenças metabólicas em humanos, com prevalência de 1:5.000^{1,2} e geralmente têm caráter multissistêmico, com mais acometimento dos órgãos que são mais dependentes da produção de energia, como sistema nervoso central (SNC), musculoesquelético, coração, sistema endócrino e rins¹.

Baseado no conjunto de manifestações clínicas, podem-se definir diferentes síndromes clínicas e, entre as síndromes mitocondriais comuns da infância, destaca-se a síndrome de Leigh (SL), cuja incidência estimada é de 1:40.000 nascidos vivos³⁻⁵. Também conhecida como encefalopatia necrosante subaguda, foi descrita primeiramente por Denis Archibaldi Leigh, psiquiatra e neuropatologista britânico, em 1951, na avaliação *post-mortem* de uma criança de sete meses de idade com história de encefalopatia grave e dificuldades respiratórias⁶.

Trata-se de doença neurodegenerativa devastadora que, tipicamente, manifesta-se na infância, embora existam casos de manifestação tardia⁷. Relata-se grande variabilidade de apresentação clínica, sendo que alguns pacientes mostram curso clínico grave e rapidamente progressivo, enquanto em outros o curso é mais lento e com manifestações menos graves. O aparecimento da sintomatologia frequentemente é consequente a algum insulto metabólico como infecção, jejum prolongado, procedimento cirúrgico⁷. Os primeiros sinais geralmente aparecem entre três e 12 meses de idade⁵ e podem incluir regressão do desenvolvimento neuropsicomotor, com perda de algumas habilidades já adquiridas. Os principais sinais e sintomas incluem hipotonia ou espasticidade, distonia, crises epiléticas, ataxia, disfagia, ptose, alteração da movimentação ocular e alterações respiratórias⁷. Em alguns pacientes há acometimento do sistema nervoso periférico (SNP), que se manifesta como miopatia ou polineuropatia. Os acometidos podem demonstrar *failure to thrive* ou retardo do desenvolvimento precocemente, mas são sinais inespecíficos da doença⁸.

Do ponto de vista genético, há também grande heterogeneidade nessa síndrome, que pode ser causada por mutações no DNAn e DNAm, que codificam subunidades da cadeia respiratória (CR)⁸, levando à redução da atividade dos complexos I, II, IV ou V da CR, deficiência da coenzima Q 10 (CoQ10), deficiência de biotina ou defeitos no complexo da piruvato desidrogenase (PDHc). Alguns desses defeitos são passíveis de tratamento, como reposição de CoQ10 e de biotina. Diferentes formas de herança genética podem estar envolvidas, como herança mitocondrial (materna), traço autossômico recessivo (mutações no DNAn) e aquelas ligadas ao cromossomo X (defeitos no PDHc).

Considerando que a SL é uma importante forma de manifestação de doença mitocondrial na infância e devido à falta de estudos nacionais acerca dessa doença, o presente estudo propõe-se a caracterizar os aspectos clínicos, neurorradiológicos e moleculares de pacientes com SL acompanhados no HC-UFMG.

5.2 Pacientes e métodos

5.2.1 Desenho do estudo, casuística e metodologia

Realizou-se estudo de série de casos de pacientes com diagnóstico de síndrome de Leigh/síndrome de Leigh-*like* acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). O diagnóstico de síndrome de Leigh (SL) e síndrome de Leigh-*like* (SLL) foi estabelecido de acordo com os critérios a seguir.

5.2.1.1 Critérios diagnósticos para SL

No presente estudo utilizaram-se os critérios diagnósticos propostos por Rahman *et AL.*, em 1996⁹:

- a) Doença neurológica progressiva com atraso do desenvolvimento motor e intelectual;
- b) sinais e sintomas de doença do tronco encefálico e/ou gânglios da base;
- c) aumento do lactato sérico e/ou do lactato no liquor;
- d) um ou mais dos seguintes:
 - i) achados característico da SL à neuroimagem (hipodensidades simétricas nos gânglios da base à tomografia computadorizada (TC) ou lesões hiperintensas em sequências ponderadas em T2 à ressonância magnética de encéfalo (RME);
 - ii) alterações neuropatológicas típicas *postmortem*; ou
 - iii) neuropatologia típica em um irmão com quadro clínico semelhante.

5.2.1.2 Critérios diagnósticos para SLL

O diagnóstico da síndrome de Leigh-*like* (SLL) foi estabelecido de acordo com critérios de Rhaman *et al.*⁹: pacientes que apresentavam fortes achados clínicos, laboratoriais e de imagem, mas não podiam ser incluídos nos critérios estritos citados, devido à neuropatologia atípica.

5.2.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos apenas os pacientes que se recusaram a participar.

5.2.2 Procedimentos

Os pacientes foram admitidos no estudo após receberem as informações necessárias e assinarem o termo de consentimento pós-informado - elaborados de acordo com a faixa etária e orientação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) - , além de autorização para realização de foto e de vídeo.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFMG, sob o número ETIC 413/04, pela Câmara do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG (FM-UFMG), pela diretoria da FM-UFMG, pelas unidades funcionais onde foram realizados os procedimentos e pelo Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão do HC-UFMG (Anexo A).

A maioria dos pacientes incluídos nesta pesquisa foi reavaliada clinicamente pelo mesmo neurologista, no período entre junho de 2013 e fevereiro de 2015, e foi preenchido protocolo elaborado com base em aspectos clínicos relevantes. Não foram reavaliados os pacientes de número 10, por não se conseguir localizá-lo (ao telefone e endereço disponíveis) e o paciente número 18, que evoluiu para óbito em 2009 (vide Tabela 1).

A pesquisa foi realizada nas dependências do Hospital das Clínicas da UFMG. A avaliação clínica e a coleta de sangue foram feitas no Ambulatório de Doenças Neuromusculares. O estudo histopatológico e molecular foi realizado no Laboratório

de Investigações de Doenças Musculares no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG.

O estudo da cadeia respiratória mitocondrial e parte do estudo molecular foram realizados na *Columbia University*, em Nova York.

5.2.2.1 Avaliação clínica e exames complementares

Os pacientes foram reavaliados clinicamente pelo mesmo neurologista por meio de anamnese, exame físico e exame neurológico. Foi preenchido um protocolo contendo os dados relevantes da história clínica e o exame neurológico (Apêndice B).

Foram levantados do prontuário dos pacientes os seguintes exames complementares, quando disponíveis: dosagem de lactato sérico, creatinoquinase (CK), eletroneuromiografia (ENMG), gasometria arterial, dosagem de aminoácidos no sangue, dosagem de ácidos orgânicos na urina, ecocardiograma, dados da avaliação oftalmológica e auditiva.

Os irmãos de alguns dos pacientes incluídos na pesquisa também foram avaliados clinicamente, na tentativa de se detectarem manifestações da doença.

5.2.2.2 Reavaliação da neuroimagem

As ressonâncias magnéticas de encéfalo (RME), realizadas previamente e em variados estabelecimentos, foram reavaliadas por duas neurorradiologistas pediatras, com o conhecimento prévio de que se tratava de exames de pacientes com o diagnóstico de SL/SLL. As imagens foram avaliadas, nas sequências disponíveis, para os seguintes aspectos: atrofia cortical e cerebelar, alteração de sinal no córtex cerebral, na substância branca supratentorial e na substância branca cerebelar, no corpo caloso, nos gânglios da base, nos tálamos, nos núcleos subtalâmicos, no tronco encefálico e no cerebelo. Apenas um paciente realizou RM de medula cervical, que também foi reavaliada. Quando disponível, as sequências ponderadas em difusão e espectroscopia foram reavaliadas.

A reavaliação das imagens pelas duas neurorradiologista aconteceu simultaneamente e em caso de discórdia em relação aos achados, houve consenso para estabelecer o resultado.

5.2.2.3 Estudo histológico e histoquímico muscular

Este estudo foi efetuado a partir de uma nova análise das lâminas das biópsias musculares estocadas, realizadas por ocasião do diagnóstico, com o objetivo de sistematizar a análise.

Em alguns pacientes, os fragmentos de músculo estocados foram utilizados para uma nova confecção de lâminas e melhor análise do estudo histoquímico muscular, mediante a autorização do paciente e/ou responsável. Foram realizadas colorações histológicas e reações enzimáticas histoquímicas: hematoxilina-eosina (HE), tricômico de Gomori modificado (GOMORI), ácido periódico de Schiff (PAS) e *Oil Red O* (ORO) e as reações histoquímicas oxidativas: succinato desidrogenase (SDH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), citocromo C oxidase (COX) e adenosina trifosfatase (ATPases) 9,4 e 4,3.

5.2.2.4 Estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial

Os resultados do estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial realizada na *Columbia University*, em 2013, de acordo com o protocolo daquela instituição, foram utilizados neste estudo.

5.2.2.5 Estudo molecular

A) Coleta do sangue e extração do DNA

O estudo molecular utilizou amostras de DNA genômico extraídas a partir da coleta de 10 mL de sangue periférico dos pacientes e de seus familiares, em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A coleta do material foi feita no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da UFMG e a extração do DNA genômico foi obtida com base em

metodologia rotineira, utilizando-se o *kit* de extração *Wizard Genomic DNA Purifications Kit* – (Promega CAT # A1125).

B) Amplificação do DNA mitocondrial

Para o estudo de mutações do DNA mitocondrial, foram utilizados quatro pares de *primers* (*forward* e *reverse*), que foram sintetizados pela empresa *IDT - Prodimol* Ltda. Entre estes, foram feitos um par de *primer* para amplificação de fragmento contendo a mutação 1644 T>G (gene tRNA valina), um par de *primer* para a mutação 3243 A>G (gene tRNA leucina), um par de *primer* para a mutação 8344 A>G (gene tRNA lisina) e um par de *primer* para as mutações 8993T>G e 8993T>C (gene ATPase 6).

Para a amplificação dos fragmentos de DNA mitocondrial, utilizou-se a técnica PCR, seguindo-se protocolo-padrão.

Depois de verificado o produto de PCR, estes foram purificados com *kit* de purificação Qiagen (Qiagen CAT#28106) com base em metodologia rotineira, para posterior sequenciamento.

C) Sequenciamento dos fragmentos de DNA mitocondrial

Para os sequenciamento foram desenhados mais três *primers*, um para cada fragmento contendo as mutações nos genes tRNA lisina, tRNA valina e ATPase 6. Para o sequenciamento da mutação do gene tRNA leucina utilizou-se o mesmo *primer* F usado para realizar reação em cadeia da polimerase (PCR) .

Após a reação de sequenciamento, os produtos de sequenciamento foram purificados por técnica que utiliza o reagente *sephadex* em placa *multiscreen* de 96 poços para os quais os produtos são transferidos para purificação e novamente transferidos para uma placa de sequenciamento, levados, então, ao sequenciador.

O sequenciamento do produto de PCR foi realizado no sequenciador ABI 373 DNA *Sequencer* (*Applied Biosystem*) de 96 capilares, de acordo com as especificações do fabricante.

D) Análise do sequenciamento

A análise dos cromatogramas foi feita manualmente, a fim de identificar heteroplasmia em pequenas proporções.

5.3 Resultados

5.3.1 População de estudo

Foram incluídos no presente estudo 18 pacientes que preenchem critérios para diagnóstico de SL/SLL.

Os dados de identificação e procedência dos pacientes estão discriminados no Quadro 1.

Quadro 1: Identificação e procedência de pacientes com SL/SLL, HC- UFMG, 2013 -2015

Paciente	Data de nascimento	Sexo	Idade atual*	Procedência
1.	20/02/1995	F	19a10m	Belo Horizonte/MG
2.	26/06/1998	M	16a 6m	Sabará/MG
3.	05/12/1995	M	19a	Mateus Leme/MG
4.	31/07/1983	M	31a 5m	Ouro Preto/MG
5.	02/01/1974	M	40a 11m	Belo Horizonte/MG
6.	12/11/2004	M	10a 1m	Cacoal/RO
7.	23/04/2003	M	11a 8m	Cacoal/RO
8.	04/04/1991	M	23a 8m	Formiga/MG
9.	26/10/2005	M	9a 2m	Juiz de Fora/MG
10.	30/06/1994	M	20a 6m	Belo Oriente/ MG
11.	31/08/1999	F	15a 4m	Contagem/MG
12.	29/01/2001	F	13a 11m	Caratinga/MG
13.	18/06/1999	M	15a 6m	Igarapé/MG
14.	20/06/1997	F	17a 6m	Nova Serrana/MG
15.	06/08/2011	M	3a 4m	Belo Horizonte/MG
16.	22/05/2007	F	7a 7m	Contagem/MG
17.	17/09/2004	M	10a 3m	-----
18.	14/11/2008	F	Óbito aos 45 DV	Belo Horizonte/MG

a: anos, m: meses, DV: dias de vida, F: feminino, M: masculino, -----: ausência de dado

*: em dezembro de 2014.

Entre os pacientes vivos, a idade variou de três a 40 anos (média de 16,8 anos). Houve preponderância de pacientes do sexo masculino, que corresponderam a 12 (66,6%) em relação aos de sexo feminino, apenas seis (33,3%). Em relação à procedência, a grande maioria mora no estado de Minas Gerais (variando entre

capital e interior), sendo apenas dois pacientes, irmãos (casos 6 e 7), procedentes do estado de Rondônia.

5.3.2 Avaliação clínica

Os pacientes número 10 e número 18 da Tabela 1 tiveram seus dados clínicos obtidos pelo levantamento do prontuário, uma vez que não se conseguiu localizar o paciente 10, e o paciente 18 evoluiu para óbito em 2009.

Entre os pacientes avaliados, 11 (61,1%) foram classificados como SLL, devido à ausência de déficit intelectual em dois casos (casos 1 e 8) e dosagem normal do lactato sérico (casos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 14, 16, 17); e os demais, como SL.

Apenas seis pacientes (33,3%) apresentaram os primeiros sinais e sintomas no primeiro ano de vida (casos 3, 6, 7, 12, 15, 18), sendo a hipotonia a manifestação clínica inicial mais frequente (1/3 dos pacientes), como indicado no Quadro 2 (casos 6, 7, 9, 12, 15, 18). Sete pacientes (38,8%) tiveram as primeiras manifestações clínicas aos dois anos de idade ou mais (casos 1, 2, 5, 8, 10, 13, 14), sendo que a média de idade de aparecimento dos sintomas foi de 3,2 anos.

Quadro 2: Manifestação inicial em pacientes com SL/SLL, HC-UFMG, 2013-2015

Paciente	Idade	Classificação SL/SLL	Primeiro sinal ou sintoma
1.	2a 6m	SLL	Deformidade MIE
2.	2a	SLL	Atraso de linguagem
3.	10m	SLL	Atraso motor
4.	1a 9m	SLL	Sonolência excessiva e crise epiléptica
5.	20a	SLL	Crise epiléptica
6.	3m	SL	Hipotonia e atraso motor
7.	3m	SL	Hipotonia
8.	3a 10m	SLL	Tremores e dificuldades para segurar objetos
9.	1a 1m	SL	Hipotonia com regressão do DNPM
10.	12a	SLL	CE, alteração da postura das mãos
11.	1a 4m	SLL	Alteração de marcha
12.	5m	SL	Hipotonia
13.	2a	SL	Atraso de linguagem
14.	6a	SLL	Alteração de marcha e coordenação motora
15.	6m	SL	Hipotonia
16.	1a 2m	SLL	Nistagmo
17.	1a 8m	SLL	Quedas frequentes da própria altura
18.	Ao nascimento	SL	Hipotonia

a: anos, m: meses, CE: crise epiléptica, dNPM: desenvolvimento neuropsicomotor, MIE: membro inferior esquerdo

Conforme dados apresentados no Quadro 3, nota-se que a maioria dos pacientes (83,3%) evoluiu com déficit ponderoestatural (casos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17). Hipotrofia em graus variados foi notada em 16 (88,8%) dos 18 pacientes (exceto os casos 3 e 9). Não foram notados dismorfismos relevantes e, por isso, tal dado não foi inserido no Quadro 3.

Quadro 3 - Avaliação neurológica de pacientes com SL/SLL, HC-UFMG, 2013-2015

Paciente	DPE	Trofismo	Ataxia	Coreia	Distonia	Espasticidade	Nistagmo	SNS	CE	GTT	TQT
1.	S	Hipotrófico	N	N	S	S	N	NA	N	N	N
2.	S	Hipotrófico	S	N	S	S	N	S	N	N	N
3.	N	Eutrófico	N	S	N	N	N	S	N	N	N
4.	S	Hipotrófico	S	N	N	S	N	NA	S	N	N
5.	S	Hipotrófico	S	N	S	S	N	N	S	N	N
6.	S	Hipotrófico	N	S	S	S	N	S	N	N	N
7.	S	Hipotrófico	S	N	N	N	N	S	N	N	N
8.	S	Hipotrófico	N	N	S	S	N	N	N	N	N
9.	N	Eutrófico	S	N	N	N	N	N	N	N	N
10.	S	Hipotrófico	N	N	S	S	N	NA	S	N	N
11.	S	Hipotrófico	S	S	S	S	N	N	N	N	N
12.	S	Hipotrófico	NA	N	S	S	N	S	S	S	N
13.	S	Hipotrófico	NA	NA	S	S	N	S	S	S	S
14.	S	Hipotrófico	NA	NA	S	S	N	N	S	S	N
15.	S	Hipotrófico	S	N	S	N	S	NA	N	N	N
16.	S	Hipotrófico	S	S	S	N	S	S	N	N	N
17.	S	Hipotrófico	S	N	S	S	N	N	N	N	N
18.	N	Hipotrófico	NA	N	N	N	N	NA	N	N	N

DPE= déficit ponderoestatural; SNS= surdez neurosensorial; CE= crise epiléptica; GTT= gastrostomia; TQT= traqueostomia; S= sim; N= não; NA= não avaliado.

Ao exame neurológico, ataxia foi encontrada em nove (64,2%) de 14 pacientes avaliados (casos 2, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 16, 17). Coreia foi um sinal registrado em quatro pacientes (25%) entre 16 (casos 3, 6, 11, 16). Distonia foi vista em 13 pacientes (72,2%) entre todos desta casuística (casos 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), sendo muito intensa e pouco responsiva ao tratamento clínico no caso 12. Espasticidade foi encontrada em 12 (66,6%) dos 18 pacientes (casos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17), geralmente intensa o suficiente para dificultar e até mesmo impedir a deambulação. Nistagmo foi um achado pouco frequente, notado em apenas dois pacientes (11,1%) (casos 15, 16). Surdez neurosensorial foi diagnosticada em sete (53,8%) de 13 pacientes avaliados (casos 2, 3, 6, 7, 12, 13, 16). Seis pacientes (33,3%) entre os 18 apresentaram crises epilépticas (casos 4, 5, 10, 12, 13, 14). Devido à disfagia grave, três pacientes (16,6%) necessitaram de gastrostomia (casos 12, 13, 14) e um deles (caso 13) (5%), devido a alterações

ventilatórias, foi traqueostomizado durante internação prolongada em centro de terapia intensiva.

5.3.2.1 Evolução clínica

No presente estudo os pacientes tiveram um curso clínico muito variável, sendo que alguns relataram intenso comprometimento motor, com relativa preservação cognitiva, enquanto outros apresentaram importante comprometimento cognitivo, inclusive impedindo qualquer comunicação com o meio.

Destacam-se dois pacientes (caso 1 e 8) que mostraram preservação cognitiva e atualmente cursam o ensino superior. Dois outros pacientes (caso 7 e 11) evoluíram com melhora motora, que permitiu o desenvolvimento de marcha independente.

Algumas famílias declararam estabilidade do quadro neurológico dos afetados nos últimos dois anos (casos 1, 2, 3, 8, 12, 17).

Até o momento, apenas um óbito foi documentado, no paciente com manifestação da doença no período neonatal (caso 18).

Pode-se observar o fenótipo clínico de dois pacientes nas Figuras 1 e 2.



Figura 1: A: paciente com 1 ano de vida, apenas com atraso de linguagem. B: aos 12 anos, com intenso comprometimento motor e cognitivo.
Fonte: da autora.



Figura 2: Paciente 19 anos, utiliza tablet para comunicar-se de maneira mais eficaz.
Fonte: da autora.

5.3.3 Avaliação laboratorial e exames complementares

Os resultados de exames complementares foram retirados dos prontuários e estão sumarizados no Quadro 4. Nota-se que muitos pacientes não apresentaram todos os resultados de exames na tabela, embora haja registro de solicitação destes. Isso se deve a diversos fatores como dificuldades de liberação da realização de exames

pele município de origem, realização dos exames em ambientes externos ao HC-UFMG sem sua apresentação nas consultas subsequentes.

Quadro 4 – Exames complementares de pacientes com SL/SLL, HC-UFMG, 2013-2015

Pac.	Lactato	Gasometria	Ácidos orgânicos	ENMG	Ecocardiograma	Avaliação Oftalmológica
1	Normal	-----	Normal	-----	Regurgitação mitral e tricúspide leve	-----
2	Normal	Sem acidose	Presença de ácido metilmalônico	Mononeuropatia do nervo fibular comum	Normal	Normal
3	Normal	Sem acidose	-----	Padrão miopático	Normal	Coroidose acentuada
4	Normal	-----	NA	NA	-----	-----
5	Normal	Sem acidose	Normal	Polineuropatia sensitivo motora axonal, moderada acentuada, crônica e simétrica	Normal	Normal
6	Aumentado	Acidose láctica	Aumento acentuado de ácido láctico, 2 OH butírico, e 3 OH butírico. Aumento moderado do ácido 3 OH valérico e diversos metabólitos do ciclo de Krebs. Pequeno aumento do ácido metilmalônico	Normal	-----	Sugestivo de distrofia retiniana
7	Aumentado	Acidose láctica	Pequeno aumento dos ácidos metilmalônico e 3 OH isovalérico. Presença de vários intermediários do ciclo de Krebs e de metilcitrato	Normal	-----	Sugestivo de distrofia retiniana
8	Aumentado	-----	Discreto aumento de ácido láctico	-----	-----	-----
9	Aumentado	Acidose láctica	Normal	-----	-----	-----
10	Normal	Sem acidose	Aumento moderado dos ácidos láctico, benzoico e succínico	Alterações miopáticas leves em musculatura proximal	-----	normal
11	Normal	Sem acidose	Aumento dos ácidos láctico, 3 OH butírico e 2 OH butírico	Polineuropatia sensitivo motora mielínica e axonal, crônica, leve a moderada. Alterações miopáticas leves.	normal	normal
12	Aumentado	Sem acidose	Normal	normal	Normal	Distrofia de fotorreceptores

Quadro 4 – Exames complementares de pacientes com SL/SLL, HC-UFMG, 2013-2015 - continuação

Pac.	Lactato	Gasometria	Ácidos orgânicos	ENMG	Ecocardiograma	Avaliação Oftalmológica
13	Aumentado	Acidose láctica	Aumento de ácido 3 metilglutacônico e 3 metilglutárico	----		
14	Normal	Sem acidose	----	normal	-----	Sugestivo de retinopatia subclínica
15	Aumentado	Sem acidose	Aumento moderado do ácido etilmalônico e succínico. Pequeno aumento dos ácidos láctico e adípico	normal	----	----
16	Normal	Sem acidose	Padrão sugestivo de acidúria orgânica	Alterações miopáticas leves	Normal	Coroidose acentuada, atrofia óptica bilateral
17	Normal	----	Normal	normal	-----	Normal
18	Aumentado	Acidose láctica	NA	NA	Miocardiopatia dilatada	NA

ENMG= eletroneuromiografia; NA= não avaliado; ---- sem informação.

Todos os pacientes foram submetidos à dosagem de lactato sérico, que se revelou aumentada em oito deles (44,4%) (casos 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 18). Dos 14 pacientes que fizeram gasometria arterial, cinco (35,7%) tinham acidose metabólica (casos 6, 7, 9, 13, 18). A dosagem de ácidos orgânicos na urina foi realizada em 14 pacientes e estava alterada em nove deles (64%) (casos 2, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 16), com variados padrões de alteração, como revelado na Tabela 4. Dos 12 pacientes submetidos à ENMG, seis (50%) (casos 2, 3, 5, 10, 11, 16) obtiveram resultados alterados, variando entre miopatia e neuropatia e um apresentou padrão misto (caso 11). O exame de ecocardiograma foi realizado em oito pacientes, com dois (25%) resultados alterados (casos 1 e 18), sendo que um apresentava regurgitação mitral e tricúspide leve, enquanto o outro paciente relatava miocardiopatia dilatada, cursando com mais gravidade. Realizou-se avaliação oftalmológica em 11 pacientes e em seis deles (54,5%) o resultado foi alterado (casos 3, 6, 7, 12, 14, 16), variando entre coroidose e alterações sugestivas de distrofia retiniana. O caso 16 (9%) apresentou também atrofia óptica bilateral.

Quadro 5 - Achados à biópsia muscular de pacientes com SL/SLL, HC-UFMG, 2013-2015

Paciente	RRF	Proliferação mitocondrial subsarcolemal	COX	Lipídeo	Glicogênio	ATPase
1.	Ausente	+	Fibras COX + e COX -	+	normal	Proporção adequada de fibras tipo I/II
2.	Ausente	+	Fibras COX+	+	+	Proporção adequada de fibras tipo I/II
3.	Biópsia realizada em outro serviço	NA	NA	NA	NA	NA
4.	NR					
5.	Presente	++	Fibras COX + e COX -	+	+	Proporção adequada de fibras tipo I/II
6.	NR					
7.	Ausente	++	Fibras COX + e COX -	+	+	Proporção adequada de fibras tipo I/II
8.	NR					
9.	Ausente	+++	Fibras COX + e COX -	+	+	Proporção adequada de fibras tipo I/II
10.	NR					
11.	Ausente	++	Fibras COX + e COX -	+	+	Proporção adequada fibras I/II
12.	NR					
13.	Ausente	+	Fibras COX +	+	+	NA
14.	Ausente	++	Fibras COX +	+	+	Maior proporção de fibra I
15.	Ausente	+++	Fibras COX +	+	+	Proporção adequada de fibras tipo I/II
16.	NR					
17.	NR					
18.	Ausente	+++	Fibras COX -	+	+	NA

RRF= *ragged red fibers* (fibras vermelhas rasgadas); COX + = COX positiva; COX - = COX negativa; NA= não avaliado; NR= não realizado (não foram submetidos à biópsia); + = leve; ++ = moderada; +++ = acentuada

Dos 18 pacientes (casos 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 18), 11 (61,1%) foram submetidos à biópsia muscular, sendo que um deles (caso 3) realizou o procedimento em outra instituição, o que impossibilitou a reavaliação de seu exame de biópsia. Entre os que realizaram o exame, apenas em um (9%) observaram-se fibras vermelhas rasgadas (caso 5). Por outro lado, todos os 10 pacientes apresentaram proliferação mitocondrial subsarcolemal.

A coexistência de fibras COX positivas (COX +) e fibras COX negativas (COX -) é conhecida como mosaico. A alteração da COX foi vista em seis pacientes (60%) (sendo que cinco deles apresentavam o padrão de mosaico - casos 1, 5, 7, 9, 11 - e um tinha deficiência total - caso 18).

Acúmulo de lipídeo foi notado em todos os 10 pacientes que tiveram seus exames reavaliados. Acúmulo de glicogênio foi constatado em oito pacientes (80%) (casos 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18).

Entre sete pacientes avaliados com a reação de ATPase, apenas um (14,2%) apresentou maior proporção de fibras tipo I (caso 14), sendo que os demais tinham adequada proporção entre as fibras I/II.

5.3.4 Reavaliação de neuroimagem

Dos 18 pacientes, três não tiveram seus exames de RME reavaliados, por indisponibilidade de das imagens; havia apenas registro do laudo dos exames em cada prontuário, que descreviam alterações características da SL. Os pacientes que realizaram mais de um exame e disponibilizaram tais imagens tiveram todos eles reavaliados (casos 2, 12 e 16). Ressalta-se que os exames foram realizados previamente a este estudo, não havendo padronização para sua realização. Nos casos em que há mais de um exame, foi considerado aquele com alteração para calcular a prevalência desta. Em geral, as alterações de sinal observadas foram as típicas de SL com hipersinal nas sequências ponderadas em T2 e *fluid attenuated inversion recovery* (FLAIR) e iso/hipossinal nas sequências ponderadas em T1. As Figuras 3 e 4 ilustram as alterações típicas da SL à RME.

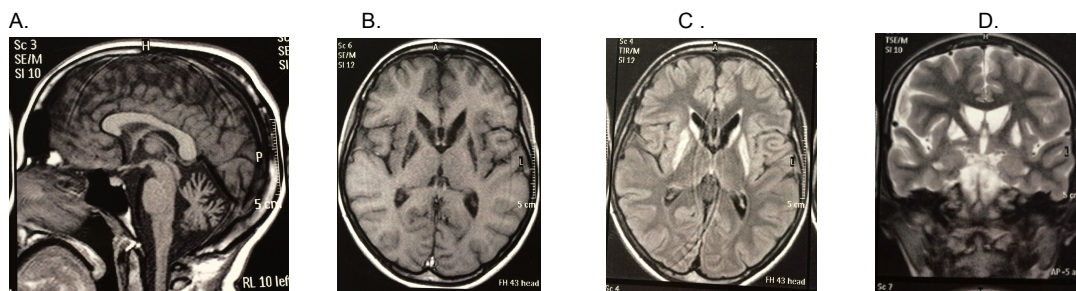


Figura 3: Achados típicos à neuroimagem.

A: atrofia cerebelar (corte sagital); B: hipossinal em núcleos da base (sequência ponderada em T1, corte axial); C: hipersinal em núcleos da base (sequência ponderada em FLAIR, corte axial); D: hipersinal em núcleos da base (sequência ponderada em T2, corte coronal).

Fonte: da autora.

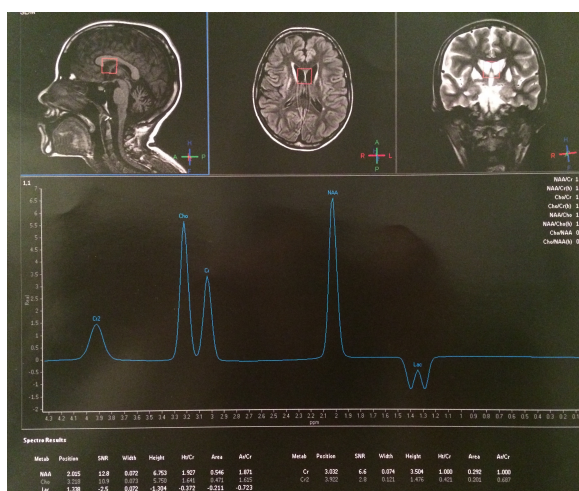


Figura 4: Duplo pico de lactato à espectroscopia realizada no sistema ventricular.

Fonte: da autora.

- Tabela 6: Alterações de neuroimagem de pacientes com SL/SLL, HC-UFGM, 2013-2015

Paciente	Data da RME	cortex		Subs branca supratent	Corpo Caloso	Ganglios da base		Talamo		Tronco encefálico			cerebelo		Medula
		Atrofia	Alt sinal			caudado	putamen	globo pallido	Nucleos subt	Subs negra	Nucleo vermelho	Nuc olivar inferior	atrofia	Nucleo dentad/pedunc med	
1.	28/06/07	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	NR
2.	28/05/07	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
3.	08/02/12	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4.	28/02/11	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	NR
5.	17/12/07	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	NR
6.	17/06/14	neg	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
7.	21/03/06	pos	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
8.	17/08/06	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
9.	NA														
10.	16/12/08	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos	NR
11.	NA														
12.	01/06/02	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
	11/11/09	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
	29/10/14	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
13.	31/08/10	pos	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	neg	NR
14.	14/04/14	pos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	NR
15.	23/05/14	pos	neg	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	NR
16.	26/02/09	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	NR
	22/04/13	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	NR
17.	24/12/07	neg	neg	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	neg	pos	neg	NR
18.	13/01/09	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	NR

Alt= alteração, NA= não avaliado, NR= não realizado, neg= negativo, nuc= núcleo, pedunc med= pedúnculo cerebelar médio, pos= positivo, subs= substância, subt= subiaâmico, RMF= ressonância magnética de encéfalo

O córtex cerebral foi avaliado em relação à atrofia, que foi vista em oito (53,3%) dos 15 pacientes (casos 2, 4, 6, 10, 13, 14, 15, 18), e à alteração de sinal, encontrada em apenas um (6,6%) entre todos (caso 10). Alteração de sinal da substância branca supratentorial foi detectada em oito pacientes (53,3%) (casos 3, 7, 10, 14, 15, 16, 17, 18); e de corpo caloso em dois (13,3%) (casos 10 e 18).

Os gânglios da base foram avaliados separadamente, sendo que a alteração de sinal foi notada no putâmen em 14 pacientes (93,3%) (casos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18), no caudado em 13 (86,6%) (casos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17) e no globo pálido em 10 (66,6%) (casos 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

Alteração de sinal nos tálamos (casos 10, 13, 15, 18) foi acusada em quatro (26,6%) pacientes, enquanto apenas três (20%) apresentaram essa alteração nos núcleos subtalâmicos (casos 1, 10, 18).

O tronco encefálico foi avaliado em relação à alteração de sinal nas seguintes topografias: substância negra, núcleo vermelho e núcleo olivar inferior. E foram encontradas alterações em dois (13,3%) (casos 10 e 18), 2 (13,3%) (casos 10 e 18) e um (6,6%) (caso 14) pacientes, respectivamente.

Atrofia cerebelar foi registrada em cinco pacientes (33,3%) (casos 4, 10, 13, 14, 18); três pacientes (20%) tinham alteração de sinal no núcleo dentado (casos 3, 14, 17) e dois (13,3%) com alteração no pedúnculo cerebelar médio (casos 10 e 16), sendo que em um deles (caso 16) tal alteração não foi mais vista em exame realizado com intervalo de quatro anos do alterado. Apenas um paciente (6,6%) mostrou alteração de sinal na substância branca cerebelar (caso 10).

Entre os 15 pacientes avaliados, apenas um realizou RM de coluna cervical, com o resultado dentro da normalidade (caso 2).

Foram avaliados sete pacientes (46,6%) por espectroscopia (casos 1, 3, 7, 12, 14, 16, 18) e em todos eles foi encontrado pico de lactato, que é uma alteração característica das doenças mitocondriais, inclusive da SL. O pico de lactato foi

encontrado nos núcleos da base em um dos pacientes (14,2%) (caso 1), no sistema ventricular em dois (28,5%) (casos 7 e 12) e simultaneamente no sistema ventricular e núcleos da base em três (42,8%) (casos 14, 16, 18). Em um paciente não foi informada a topografia em que a espectroscopia foi realizada (caso 3). Além desses sete pacientes, encontraram-se dados de avaliação por espectroscopia no prontuário de outros cinco pacientes (casos 2, 5, 10, 16, 17), com pico de lactato nos exames dos pacientes 2, 5 e 16, totalizando esse pico em 83,3% dos pacientes avaliados (10 pacientes entre 12 avaliados). No prontuário do paciente 10 há relato de pico de glutamato. A espectroscopia não teve alteração no paciente 17.

5.3.5 Avaliação do estudo bioquímico da cadeia respiratória e avaliação molecular

Quadro 7 – Estudo bioquímico da cadeia respiratória e pesquisa das mutações no DNAmít em pacientes com SL/SLL, HC-UFMG, 2013-2015

Pac.	Estudo de cadeia respiratória	Estudo genético Mutações - DNA mitocondrial (1644T>G;3243A>G;8344A>G, 8993T>C; 9883 T>G)
1.	Complexo I baixo	Normal
2.	Inconclusivo (citato baixo não podendo confiar nos resultados)	Normal
3.	Não tem material (biópsia realizada em outro serviço)	Normal
4.	Normal	Normal
5.	Normal	Normal
6.	NR	Normal
7.	Material insuficiente	Normal
8.	Normal	Normal
9.	Material insuficiente	Sem material
10.	Material insuficiente	Sem material
11.	Complexo IV baixo	Normal
12.	NR	NR
13.	Normal	Normal
14.	Normal	Normal
15.	Normal	Normal
16.	NR	NR
17.	NR	NR
18.	NR	NR

NR= não realizada; tRNA= RNA transportador.

O estudo bioquímico da cadeia respiratória (EBCR) foi realizado em alguns pacientes conforme disponibilidade de material e qualidade da amostra. Entre os nove pacientes que foram avaliados, seis (66,6%) tinham resultado dentro da normalidade (casos 4, 5, 8, 13, 14, 15), um (11,1%) teve o resultado inconclusivo

(caso 2), um (11,1%) apresentou deficiência do complexo I (caso 1) e um (11,1%) com deficiência de complexo IV (caso 11).

O estudo genético foi realizado em 12 pacientes (66,6%) e não foram encontradas qualquer das cinco mutações do DNAmít pesquisadas: 1644 T>G (gene tRNA Valina), 3243 A>G (gene tRNA leucina), 8344 A>G (gene tRNA Lisina) , 8993T>C e 8993T>G (gene ATPase 6).

5.4 Discussão

5.4.1 Quadro clínico

Entre os 18 pacientes desta casuística houve preponderância de pacientes do sexo masculino em relação aos do sexo feminino (2:1). Na literatura, os poucos estudos que citam diferença de acometimento entre os sexos revelam maior proporção de acometimento entre pacientes do sexo masculino, embora essa diferença não chegue a ser tão expressiva como a encontrada^{9,10}, o que pode decorrer do pequeno tamanho desta amostra. Em 2007, ao avaliarem 124 pacientes com o diagnóstico de SL/SLL, foi obtida proporção entre os sexos semelhante à deste estudo: 83 homens e 41 mulheres¹⁰.

A idade dos pacientes avaliados variou de 3,3 anos a 40,9 anos, com média de 16,8 anos, e apenas um óbito documentado, ocorrido com idade de um mês, após manifestação grave no período neonatal. O curso clínico dos pacientes do presente estudo mostrou-se crônico, resultando em taxa de sobrevivência de 94,4% até o momento. Esse achado é diferente dos relatos prévios da literatura, que destacam idade precoce ao óbito, cerca de dois anos após o aparecimento dos primeiros sintomas, ainda na infância. Em 1996, foi relatada sobrevivência de 20% por volta de 20 anos de idade, sendo que o óbito geralmente ocorre entre dois e três anos de idade⁹. Em estudo de 2014, no qual foram avaliados 130 pacientes com o diagnóstico de SL, o índice de sobrevivência durante a análise foi de 40,8% e a idade média de óbito foi de 2,4 anos¹¹.

A idade de aparecimento dos primeiros sintomas variou entre os primeiros dias de vida até a idade de 20 anos, com média de 3,2 anos, idade superior à descrita na literatura. Apenas seis pacientes manifestaram a doença no primeiro ano de vida. Um paciente manifestou os primeiros sintomas aos 20 anos, já na vida adulta⁶. Em pesquisa englobando 65 pacientes, verificou-se que o aparecimento dos sintomas ocorreu ao nascimento em 15% dos pacientes, por volta de um mês de vida em 75% dos casos e, após um mês, em apenas 9% dos casos³. Os autores reforçam que, tipicamente, a doença manifesta-se nos primeiros dois anos de vida, o que aconteceu em 77,7% da amostra desta casuística.

Estudo multicêntrico envolvendo 130 pacientes com o diagnóstico de SL revelou que a média de idade de aparecimento dos primeiros sintomas foi de sete meses e, aos dois anos de vida, 80,8% dos pacientes já haviam manifestado a doença¹¹. A idade de dois anos como a idade de corte entre a SL de manifestação precoce e de manifestação tardia foi sugerida em pesquisa realizada em 2004¹¹. Na presente investigação, 61,1% dos pacientes apresentaram a doença com idade inferior a dois anos (casos 3, 4, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 18).

O aparecimento dos sintomas na adolescência ou até mesmo na vida adulta é descrito na literatura, embora todos os autores reforcem que a SL é uma doença mitocondrial primordialmente de manifestação na infância. Os pacientes com manifestação tardia na adolescência ou na vida adulta podem apresentar os achados típicos da doença ou podem manifestá-la com quase nenhuma alteração neurológica³.

O motivo dessa diferença de curso clínico e início dos sintomas um pouco mais tardio na presente casuística pode estar relacionado ao defeito genético de base, uma vez que a heterogeneidade genética é comum nessa condição com diversos genes envolvidos na patogênese dessa doença. Destaca-se na literatura que mutações no gene nuclear SURF1, um dos principais defeitos genéticos da SL em algumas casuísticas, cursam com quadro clínico grave. Esse gene está associado a acentuada deficiência do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial, levando a óbito precoce. No presente trabalho, o único paciente (caso 18) com manifestação clínica e óbito precoce tinha deficiência total do complexo IV. O quadro clínico

(miopatia + cardiomiopatia) e histopatológico desse paciente era sugestivo de mutações no gene nuclear SCO2, que se confirmou pelo sequenciamento desse gene¹².

Considerando as manifestações clínicas iniciais, em 2014 observou-se que as alterações motoras ocorreram na maioria (82,2%) dos 130 pacientes com SL de sua casuística¹¹. Entre as alterações motoras, a hipotonia foi a alteração mais comum (59,2%). Em seguida, outros achados comuns foram: alterações oculares (25%), dificuldades de sucção/deglutição (14,1%), crises epiléticas (13,3%) e *failure to thrive* (10,2%). De acordo com a literatura, na presente pesquisa verificou-se que as alterações motoras foram as manifestações iniciais mais prevalentes, encontradas em 13 pacientes (72,2%), sendo que a hipotonia correspondeu a quase metade dessas alterações, atingindo 46,1% dos 13 pacientes.

As crises epiléticas também apresentaram frequência semelhante àquela descrita por Sofou *et al.*¹¹: ocorreu em três pacientes (16,6%). Por outro lado, diferentemente dos achados previamente descritos, as alterações oculares, entre elas o nistagmo, mostrou-se pouco frequente na presente casuística, encontrado em apenas um paciente (5,5 %).

Quanto às manifestações clínicas mais frequentes ao longo do curso da doença, destacou-se o déficit de ganho ponderoestatural, apurado no exame físico de 83,3% dos pacientes (casos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), geralmente associado à hipotrofia muscular, de intensidade variada, que foi vista em 16 (88,8%) dos 18 pacientes incluídos neste estudo (só não foi encontrada nos casos 3 e 9).

Entre as manifestações motoras mais frequentes citam-se a distonia (72,2%) (casos 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), espasticidade (66,6%) (casos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17), seguidas por ataxia (64,2%) (casos 2, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 16, 17) e coreia (25%) (casos 3, 6, 11, 16). Para os mesmos autores, a alteração motora mais frequente durante a evolução da doença foi hipotonia (74,6%); distonia foi encontrada em 44,6% dos pacientes¹¹. Eles reportam que distonia, espasticidade, hipertonia e coreoatetose foram pouco frequentes como manifestação inicial, mas desenvolveram-se com a evolução do quadro.

Ainda considerando o curso da doença, encontrou-se o nistagmo em apenas dois (11,1%) dos 18 pacientes, diferentemente do que foi observado por Sofou *et al.*¹¹, que acusaram tal achado em 23,8% dos seus pacientes. Outros autores¹⁰, em 2007, ao avaliarem 124 pacientes com o diagnóstico de SL/SLL, detectaram que 12,1% deles tinham nistagmo, semelhantemente a esta casuística. A prevalência de crises epiléticas no atual estudo foi de 33,3%, em consonância ao obtido por pesquisa que relatou essa manifestação em 39,2% de seus pacientes¹¹. No entanto, em outro estudo que avaliou 25 pacientes com o diagnóstico de SL, taxas mais elevadas de crises epiléticas foram descritas, chegando a acometer 64% dos pacientes no decorrer da doença e alguns casos com resistência às medicações⁸. Na avaliação de 124 pacientes, apenas 4,8% manifestavam crises epiléticas, evidenciando grande heterogeneidade de apresentação clínica entre as populações estudadas¹⁰.

Entre os pacientes examinados, três (16,6%) apresentaram disfagia, com necessidade de gastrostomia (casos 12, 13, 14)¹¹. O número de pacientes gastrostomizados era de 33% e 20% recebiam dieta por sonda. Nota-se, portanto, grande diferença no uso da gastrostomia, que pode estar associado a uma diferença de curso clínico da doença, com casos menos graves entre os pacientes do estudo atual. Deve-se ressaltar também que, no meio em que o presente estudo foi realizado, existe grande resistência por parte dos familiares à aceitação do uso de gastrostomia, que tendem a adiar ao máximo esse procedimento.

É descrito na literatura que os pacientes com SL podem apresentar disfunção respiratória ao longo do curso da doença. Tal alteração foi descrita em 37,7% dos pacientes analisados em 2014¹¹, com hiperventilação e/ou padrão respiratório anormal em 20% deles, seguido por apneia em 16,1% deles. Já em pesquisa de 2007 foi constatado distúrbio ventilatório em 46,6% dos pacientes¹⁰. No presente estudo não se teve acesso a esses dados ou não foi descrito por familiares, sendo que apenas um paciente (5%) necessitou de traqueostomia após internação prolongada em unidade de terapia intensiva com necessidade de suporte ventilatório durante semanas (caso 13).

Por outro lado, entre os pacientes do presente estudo observou-se surdez neurossensorial (SNS) em sete (53,8%) dos 13 pacientes que foram submetidos a

essa avaliação. Foram referidas: alteração auditiva em 25 (19%) dos 130 pacientes, sendo neurossensorial em 22 (17%)¹¹; e alteração auditiva em cinco (37%) dos 25 pacientes avaliados, número também inferior ao encontrado nesta casuística⁸. Na literatura esse achado é pouco frequente na SL, de forma geral, porém pode ser mais comum em decorrência de mutações em genes específicos tais como SUCLA2, SERAC1, SUCLG1, etc. Portanto, maior frequência de surdez verificada na presente casuística pode estar relacionada aos seus defeitos genéticos que ainda não foram determinados ou simplesmente por falta de estudo específico em trabalhos prévios da literatura, pois muitos não incluem essa avaliação.

A disfunção cardíaca na SL é descrita na literatura associada a miocardiopatia hipertrófica e/ou dilatada bem como distúrbios de condução/arritmia^{1,3,5,11}. Entre os 18 pacientes avaliados, embora geralmente todos sejam encaminhados para avaliação e acompanhamento cardiológico, foi encontrado registro de tal avaliação em apenas oito deles. Entre estes, dois exibiram alteração ao ecocardiograma, sendo que um consistia em leve regurgitação de valva mitral e tricúspide (achado inespecífico) (caso 1) e o outro, miocardiopatia dilatada (caso 18).

Avaliação oftalmológica foi realizada em 11 pacientes por meio do exame de fundoscopia, sendo que em seis (54,5%) o resultado estava alterado (casos 3, 6, 7, 12, 14, 16), variando entre coroidose acentuada e padrão sugestivo de distrofia retiniana, sendo esta citada como um achado da SL³. Por outro lado, uma alteração oftalmológica descrita com frequência na literatura em relação à SL é a atrofia óptica, que foi percebida em 1(9%) entre todos os pacientes avaliados.

A literatura referencia que as manifestações de SL no sistema nervoso periférico podem ser tanto neuropatia como miopatia^{1,3}. Autores constataram neuropatia periférica em 6,9%¹¹ e em 7,9%¹⁰ dos pacientes por eles acompanhados. Entre os 18 pacientes avaliados, 12 realizaram ENMG, com o resultado alterado em seis deles (50%): três (50%) com alterações miopáticas (casos 3,10,16), dois (16,6%) com neuropatia (casos 2, 5) e um (8,3%) com padrão misto (caso 11), revelando prevalência de neuropatia um pouco acima do encontrado na literatura.

5.4.2 Achados laboratoriais

Entre os exames bioquímicos que são utilizados na abordagem inicial de pacientes com suspeita de doença mitocondrial/SL, citam-se tradicionalmente a gasometria e a dosagem sérica de lactato e de piruvato. No entanto, ressalta-se que vários fatores podem interferir nos resultados desses exames, tais como: problemas na coleta, sendo mais indicada a coleta arterial; o momento da coleta, com descrição de que a coleta pós-prandial pode ser mais adequada para detecção do aumento de lactato em pacientes com suspeita de doença mitocondrial. Além disso, podem ocorrer oscilações nos valores desses exames em um mesmo indivíduo de acordo com o tempo de evolução da doença ou com momentos de estresse (ex: infecção), que podem levar a mais descontrole metabólico⁷.

Assim, a positividade desses exames pode variar entre os diferentes trabalhos: aumento de lactato plasmático e/ou no liquor em 75% dos pacientes avaliados para tais parâmetros¹¹; graus variados de aumento de lactato sérico e/ou no liquor em 84% dos pacientes⁸; acidemia láctica em 96% dos 124 pacientes avaliados¹⁰. No presente estudo encontrou-se lactato sérico elevado em 44,4% dos 18 pacientes (casos 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 18) e acidose metabólica em 37,7% (cinco de 14 pacientes que foram submetidos à gasometria) (casos 6, 7, 9, 13, 18), valor inferior ao frequentemente descrito na literatura. Nota-se, portanto, que esses exames podem ser fracos preditores de doença mitocondrial/SL.

Mais recentemente, tem-se utilizado a dosagem de FGF -21, ainda não disponível no nosso meio. Acredita-se que a sinalização pelo FGF-21 seja uma resposta adaptativa à redução energética, resultando em diversas alterações metabólicas, incluindo aumento na função mitocondrial, na biogênese e no metabolismo energético. Dessa forma, é possível que esse estado de redução energética causado pelas doenças mitocondriais possa induzir o aumento da expressão do FGF-21, em um esforço contra a deficiência metabólica subjacente, sendo, assim, um biomarcador útil. Há 91% de chance de identificar corretamente um paciente com doença mitocondrial pela dosagem do FGF-21 sérico contra 56, 76, 62 e 71% pela dosagem da creatinoquinase (CK), lactato, piruvato e índice lactato/piruvato, respectivamente¹³. Dessa forma, dosagem sérica do FGF-21 tem se mostrado uma

ferramenta promissora para estratificar pacientes para subsequentes investigações, como biópsia muscular ou sequenciamento de nova geração, a fim de confirmar-se o defeito bioquímico e genético da doença mitocondrial¹³.

A dosagem de ácidos orgânicos urinários por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) é também uma importante ferramenta de triagem para as doenças mitocondriais/SL. Nessas doenças pode-se encontrar a excreção aumentada dos seguintes ácidos orgânicos: 2-oxiglutarato, succinato, fumarato, malato (intermediários do ciclo do ácido cítrico), assim como ácido etilmalônico, ácido metilmalônico e ácido metilglutacônico, que podem estar aumentados. Tais achados são inespecíficos, mas sinalizam disfunção da cadeia respiratória mitocondrial. Neste estudo realizou-se a dosagem de ácidos orgânicos na urina em 14 dos 18 pacientes, com resultado alterado em nove deles (64%) (casos 2, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 16).

Mais recentemente, vem sendo descrita correlação entre manifestações clínicas específicas, excreção de ácidos orgânicos urinários e mutações em genes específicos. Acidúria 3 metilglutacônica, surdez e encefalopatia em pacientes com SL podem ser causadas por mutações no gene SERAC1⁷. Outra associação descrita é a acidúria metilmalônica, encefalopatia, distonia e surdez, causadas por mutações no gene SUCLA2 e SUCLG1^{7,14}. O paciente número 13 deste estudo tem surdez, encefalopatia e excreção aumentada de ácido 3-metilglutacônico e ácido 3-metilglutárico, tornando-o candidato à pesquisa de mutações no gene SERAC1. Outros três pacientes (números 2, 6, 7) demonstram excreção aumentada de ácido metilmalônico associado a surdez e graus variáveis de distonia, tornando-os candidatos à triagem de mutações nos genes SUCLA2 e SUCLG1.

5.4.3. Achados à neuroimagem

A SL/SLL tem entre seus critérios diagnósticos os achados de neuroimagem, que são fundamentais para o reconhecimento dessa doença. As alterações de neuroimagem à RME características da SL são lesões simétricas, bilaterais e hiperintensas nas sequências ponderadas em T2, mais comumente nas seguintes topografias: gânglios basais, especialmente no putâmen, ou em outras diversas

áreas do tronco encefálico, como substância negra, núcleo rubro⁷. Apesar de não ser considerado um achado de neuroimagem essencial na SL, as alterações de substância branca também podem ser notadas nos exames desses pacientes, porém com frequência menor que as lesões previamente citadas.

Em uma série de casos com diagnóstico de SL foram analisados os exames de neuroimagem durante o curso clínico de oito pacientes, com exames seriados dos sete meses aos 12 anos de vida¹⁵. Eles dividiram as lesões de acordo com três regiões afetadas do encéfalo: núcleos da base, tronco encefálico e substância branca. Acometimento dos gânglios basais foi acusado em quatro pacientes (50%) antes do acometimento no tronco encefálico. Dois pacientes (25%) manifestaram inicialmente lesões no tronco encefálico sem acometimento dos gânglios basais ou da substância branca. Outros dois (25%) tiveram o acometimento inicial na substância branca com posterior acometimento do tronco encefálico.

Em revisão de casos da literatura feita por esses dois autores, dos 41 pacientes com diagnóstico de SL, 51% apresentaram lesões com padrão de acometimento dos núcleos basais, 36% com padrão de acometimento do tronco encefálico e 5% com padrão de acometimento da substância branca. De forma semelhante, no presente estudo o comprometimento dos núcleos da base foi o mais frequente entre os 15 pacientes que tiveram seus exames de neuroimagem avaliados, ocorrendo em 100% dos casos. E o tronco encefálico mostrou-se alterado em 20% dos pacientes (casos 10,14,18). A substância branca foi anormal em oito pacientes (53,3%) (casos 3, 7, 10, 14, 15, 16, 17, 18), porém em graus variados, sendo mais evidente e difuso em dois casos, correspondendo a 13,3% (10 e 18). Um paciente (número 10) teve alteração de sinal em substância branca cerebral difusa, com formação de cistos, sendo o único com alteração da substância branca cerebelar (6,6%).

Considerando a distribuição das lesões nos núcleos da base, notou-se neste estudo um envolvimento mais frequente do putâmen em 93,3% dos casos, seguido pelo acometimento do núcleo caudado em 86,6%. Essas descobertas são compatíveis com descrições prévias na literatura, nas quais a lesão do putâmen é reconhecida como altamente característica da SL, apesar de não ser patognomônica e poderem ocorrer também outras síndromes mitocondriais^{7,15}.

Na literatura, a alteração de sinal nos núcleos olivares inferiores pode estar associada a mutações no gene SURF1^{16,17,18}. As mutações nesse gene associam-se a acentuada deficiência do complexo IV e quadro clínico grave, com óbito precoce. Em relação ao comprometimento topográfico do tronco encefálico, apenas um paciente (6,6%) (caso 14) apresentou alteração de sinal no núcleo olivar inferior. Em sua avaliação clínica, apesar de importante comprometimento neurológico, a progressão da doença mostrou-se lenta e na biópsia muscular detectaram-se fibras COX positivas, tornando-se improvável que o defeito genético nesse paciente estivesse associado a mutações do gene SURF1.

Em concordância com esse achado, em 2014 verificou-se degeneração olivar hipertrófica em 40% das crianças com o diagnóstico de SL ou SLL¹⁸. Pacientes com mutações em outros genes que não o SURF1 também apresentaram a alteração, indicando que não é exclusiva dessa mutação.

Quanto ao envolvimento da substância branca supratentorial, na presente pesquisa ocorreu em um paciente (caso 10) de forma extensa e com degeneração multicística, podendo ser um achado da deficiência de complexo I ou IV, que não pôde ser confirmado devido à descontinuidade do tratamento. O outro paciente (caso 18) com envolvimento difuso e acentuado da substância branca teve deficiência total de COX à biópsia muscular, ou seja, deficiência do complexo IV, direcionando o estudo molecular, que confirmou mutação no gene SCO2^{12,15,19}.

Esses resultados estão de acordo com os de van der Knapp²⁰, em 2008, que sugeriu alguns padrões de alteração na substância branca mais relacionados a cada defeito básico da CR. Os pacientes com deficiência isolada do complexo I podem exibir extensa leucoencefalopatia cerebral, com edema da substância branca anormal na fase inicial, evoluindo para degeneração macrocística. O corpo caloso geralmente está envolvido, mais frequentemente em sua porção posterior. Pode haver alteração de sinal no córtex cerebral ou cerebelar, com atrofia na evolução. Na deficiência do complexo II a substância branca cerebral pode estar extensamente acometida na presença ou ausência de acometimento dos núcleos da base e do tálamo. O corpo caloso pode estar envolvido, principalmente em sua porção posterior. Na deficiência do complexo IV pode haver leucoencefalopatia difusa ou menos extensa da

substância branca cerebral, que pode conter pequenos cistos. Já na SL relacionada à mutação no gene mitocondrial que codifica a subunidade 6 da ATP sintetase (complexo V), não se percebeu leucoencefalopatia.

Em exames seriados durante o curso da doença há progressivo envolvimento progressivo das diferentes topografias do encéfalo¹⁵. Exames de RME sequenciais evidenciaram que a distribuição das lesões antes do óbito foi a seguinte: gânglios basais (n=8), tronco encefálico superior (n=8), tronco encefálico inferior (n=7), substância branca cerebelar (n=4), substância cinzenta em medula espinhal (n=2). Essa distribuição, quando comparada aos exames iniciais, mostrou extensão das lesões em todas as topografias, especialmente nos gânglios da base e tronco encefálico. Nesse mesmo estudo, os autores concluíram que as lesões de tronco encefálico estão associadas a alterações do padrão respiratório e são muito sugestivas de SL, mas não é possível prever o surgimento de insuficiência respiratória que evolua para o óbito apenas baseado em achados clínicos ou de neuroimagem. Diferentemente, no presente estudo um paciente necessitou de traqueostomia (número 13), mas não foi preciso manter suporte ventilatório e seu exame de RME não revelou anormalidades no tronco encefálico.

Entre os três pacientes que tiveram mais de um exame de neuroimagem reavaliado (números 2, 12 e 16), notou-se aparecimento de atrofia cortical no paciente número 2 durante o curso da doença, apesar de estabilidade clínica nos últimos anos. No paciente número 16 a alteração de sinal notada em pedúnculo cerebelar médio não foi vista no exame seguinte, cerca de quatro anos após o primeiro. O paciente 12 manteve o padrão de acometimento pelas lesões, sem envolvimento de novas topografias.

Relação contraditória entre a extensão e progressão das lesões com a progressão da doença também foi citada em 2013, sendo que em três pacientes com diagnóstico de SL houve redução ou desaparecimento da hiperintensidade de sinal em exames de RME durante o seguimento, assim como ocorreu com o paciente 16 desta casuística²¹. Ressalta-se ainda que, apesar de pouco usual entre as doenças mitocondriais, que geralmente têm curso progressivo, já foram descritas mutações

em genes mitocondriais e nucleares que podem evoluir com curso benigno e, inclusive, com melhora ao longo da vida^{22,23}.

Um exame não invasivo e bastante útil para se fazer nos pacientes com provável diagnóstico de SL é a espectroscopia de prótons. Sete pacientes (46,6%) deste estudo tiveram o exame de espectroscopia reavaliado (números 1, 3, 7, 12, 14, 16, 18) e em todos eles foi encontrado pico de lactato, sendo nos núcleos da base em um deles (14,2%) (número 1), no sistema ventricular em dois (28,5%) (números 7 e 12) e simultaneamente no sistema ventricular e núcleos da base em três (42,8%) (números 14, 16, 18). Em um paciente não foi informada a topografia em que a espectroscopia foi realizada (número 3). Conforme dados encontrados nos prontuários médicos, outros cinco pacientes realizaram avaliação por espectroscopia e em três deles encontrou-se pico de lactato (casos 2, 5, 16). No paciente 10 houve pico de glutamato, mas não foi detalhado o tempo de eco (TE) em que a espectroscopia foi realizada. Como o pico de glutamato é encontrado quando se utiliza TE curto e o pico de lactato quando se utiliza TE longo, não se pode excluir totalmente neste caso a ausência de pico de lactato. A espectroscopia do paciente 17 não acusou alteração. Essa técnica de exame pode ser mais sensível para detecção de aumento de lactato do que a dosagem plasmática do mesmo.

Estudo com 22 pacientes em investigação diagnóstica para doença mitocondrial apurou relação positiva entre a dosagem de lactato do liquor e o pico de lactato à espectroscopia, que preferencialmente deve ser realizada no sistema ventricular²⁴.

5.4.4 Biópsia muscular: histopatologia e estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial

Tradicionalmente, na investigação das doenças mitocondriais, utiliza-se a biópsia muscular com estudo histoquímico. No entanto, ressalta-se ampla variabilidade no resultado desses estudos, especialmente na SL/SLL, sendo descrito resultado normal, pouco alterado ou marcadamente alterado³. Entre os 10 pacientes submetidos à biópsia muscular cujas lâminas foram reavaliadas na presente pesquisa, apenas um paciente (número 5) apresentou fibras vermelhas rasgadas. Trata-se do único paciente que manifestou os primeiros sintomas na vida adulta e,

dessa forma, foi submetido à biópsia muscular mais tardiamente. Fibras vermelhas rasgadas são pouco frequentes entre os pacientes pediátricos, exceto naqueles com grandes deleções do DNAmít e/ou em mutações de genes mitocondriais associados à síntese proteica (tRNA e rRNA). A literatura cita como raro o encontro de fibras vermelhas rasgadas na SL³, principalmente naqueles pacientes com manifestação na infância, situação na qual o cérebro é preferencialmente acometido.

Achados mais discretos, como leve acúmulo mitocondrial subsarcolemal, de lipídeos e de glicogênio nas fibras musculares, são mais frequentemente observados em pacientes com SL/SLL, especialmente quando associados a mutações em genes nucleares³. Tais dados mais discretos foram obtidos na maioria dos pacientes avaliados neste estudo. A reação histoquímica COX avalia a atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial. Fibras COX positivas junto a fibras COX negativas são denominadas padrão mosaico e denotam disfunção parcial do complexo IV. No presente trabalho, o padrão mosaico na reação COX foi encontrado em cinco pacientes (50% dos avaliados) (casos 1, 5, 7, 9, 11). Esse padrão geralmente é consequência de mutações do DNAmít relacionadas aos genes envolvidos na síntese proteica mitocondrial (RNA transportadores e ribossômicos) e dos grandes rearranjos do DNAmít. Além disso, também pode ser observado em pacientes com mutações em genes nucleares que interferem na estabilidade ou formação do DNA mitocondrial (ex: genes associados à síndrome de depleção do DNA mitocondrial).

Por outro lado, um paciente desta casuística (caso 18) apresentou deficiência total de COX, sugerindo uma disfunção primária desse complexo da cadeia respiratória mitocondrial. A deficiência total de COX é associada a mutações em genes nucleares ou mitocondriais que codificam proteínas estruturais do complexo IV ou responsáveis por sua estabilidade. O paciente 18 com deficiência total de COX apresentou quadro grave de início precoce e curso fatal com óbito aos 45 dias de vida. Diante do quadro clínico (hipotonia global acentuada, cardiomiopatia dilatada, acidose láctica) associado ao achado histopatológico (deficiência total de COX) foi sequenciado o gene SCO2 e identificada uma mutação em heterozigose composta¹².

O estudo bioquímico da cadeia respiratória mitocondrial é também uma ferramenta muito útil no estudo das doenças mitocondriais/SL, pois permite avaliar o funcionamento de cada complexo da CR mitocondrial. Tradicionalmente, a partir dos dados encontrados neste estudo, segue-se a análise genética, que é direcionada para genes associados ao complexo que se encontra deficiente. Foram submetidos a EBCR nove pacientes, sendo que um teve resultado inconclusivo devido à amostra ter mostrado qualidade supostamente inadequada; 66,6% dos pacientes (casos 4, 5, 8, 13, 14, 15) avaliados tiveram resultado normal; um (11,1%) apresentou deficiência de complexo I (caso 1) e um (11,1%), deficiência de complexo IV (caso 11). Portanto, o EBCR mostrou-se normal na maioria dos pacientes submetidos a essa análise, o que é descrito na literatura tendo em vista que o órgão mais acometido por SL é o sistema nervoso e menos frequentemente o tecido muscular. De forma semelhante, ao estudarem 23 pacientes com SL, encontrou-se EBCR normal em 57% deles⁸. Dos 43% de pacientes com atividade das enzimas da CR alteradas, metade deles tinha deficiência isolada do complexo I e na outra metade foi encontrada deficiência combinada das enzimas.

5.4.5 Estudo molecular: pesquisa das mutações no DNAmít

A SL tem sua etiologia relacionada aos dois genomas humanos: DNA mitocondrial e DNA nuclear. Algumas mutações do DNA mitocondrial são mais frequentemente associadas à SL/SLL, tais como as mutações avaliadas neste estudo. No entanto, à medida que estudos genéticos foram realizados, novos genes, principalmente de origem nuclear, vêm sendo relacionados a essa síndrome. Dados atuais mostram que as doenças mitocondriais que se manifestam na infância frequentemente estão associadas a mutações em genes nucleares, podendo chegar a 70-75% dos casos, enquanto que as mutações do DNA mitocondrial nessa faixa etária correspondem a apenas 25-30% dos casos^{1,25,26}. Em 2007, foram analisados 124 pacientes com SL/SLL, dos quais 25,8% tiveram o defeito molecular identificado. Alteração do genoma mitocondrial foi identificada em apenas seis (4,8%), localizadas no nucleotídeo 8993 (dois pacientes com a troca T>G e outros dois com a troca T>C) e no nucleotídeo 3243 (dois pacientes com a troca A>G)¹⁰.

A pesquisa das cinco mutações no DNAmít (3243A>G; 8344A>G; 8993T>G; 8993T>C; 1644T>G) foi negativa nos 12 pacientes em que foi realizada, em conformidade com dados descritos na literatura.

Nos últimos anos, grandes avanços ocorreram nas técnicas aplicadas à Biologia Molecular, culminando com o surgimento do sequenciamento de nova geração. Essa metodologia fornece muitas vantagens em relação às outras previamente utilizadas, uma vez que permitiu aumento da velocidade e redução do preço da análise ampliada do genoma humano. A partir desse método tornou-se possível o sequenciamento simultâneo de diversos genes, que vem sendo aplicado na construção de painéis para doenças com grande heterogeneidade genética, bem como permitiu em um só experimento sequenciar todo o DNA mitocondrial. Mais recentemente, o SNG passou a ser utilizado para avaliar todas as regiões codificadoras (éxons) do genoma humano, estudo este que é descrito como exoma.

O exoma tem se mostrado uma ferramenta poderosa para identificar defeitos genéticos em doenças mendelianas, permitindo a triagem de mutações em genes já conhecidos, mas também em genes ainda não relacionados a doenças humanas²⁷. O exoma vem sendo utilizado na investigação das doenças mitocondriais e na SL, com resultados mais efetivos do que o estudo de mutações específicas relacionadas ao fenótipo clínico e histopatológico do paciente. Alguns trabalhos mais recentes ressaltam a tendência à reorganização do fluxograma de diagnóstico das doenças mitocondriais, incluindo o SNG com sequenciamento de todo o DNA mitocondrial bem como o uso do exoma, em etapas mais precoces da investigação de pacientes com suspeita de doença mitocondrial²⁷.

No entanto, no nosso meio o uso dessa ferramenta é ainda inicial e restrito a centros de pesquisa mais avançados. Destaca-se que a SL, em futuro próximo, terá sua propedêutica baseada nesse método, uma vez que apresenta grande heterogeneidade genética, com o envolvimento dos dois genomas na sua etiologia (Apêndice A).

5.5 Conclusão

A SL é considerada a encefalopatia mitocondrial mais frequente na infância, porém até o presente momento não existem pesquisas que permitam estabelecer estreita relação entre achados clínicos, laboratoriais, radiológicos e moleculares.

No presente estudo, os dados avaliados, em geral, foram concordantes com a literatura. Entre os achados clínicos, porém, destacou-se taxa de sobrevivência mais alta que a descrita na literatura, que pode ser consequência de defeitos genéticos prevalentes na população estudada que diferem dos encontrados em outros países. Entre os exames laboratoriais ressaltou-se que a dosagem sérica de lactato esteve alterada em poucos pacientes, mostrando que não é exame de triagem muito sensível, assim como em outros estudos prévios. A espectroscopia por ressonância revelou-se método com mais sensibilidade para detecção de lactato e por isso deveria ser realizado rotineiramente na investigação de pacientes com suspeita de SL ou doenças mitocondriais.

Os exames de ressonância magnética reavaliados evidenciaram achados típicos da SL, com envolvimento predominante em núcleos da base, mais frequentemente em putâmen. O envolvimento da substância branca supratentorial de forma difusa e acentuada ocorreu com menos frequência e em um paciente pôde ser associado a defeito do complexo IV, com mutações no gene SCO2.

O estudo histopatológico com análise histoquímica e bioquímica da CR mitocondrial foi normal na maioria dos pacientes, concordante com o que referencia a literatura. No entanto, em alguns casos apuraram-se achados específicos que podem facilitar a condução do estudo genético (ex: caso 1 e 11).

As mutações do DNAmít pesquisadas não foram encontradas nos pacientes estudados, em consonância com os estudos que afirmam que as mutações no DNA nuclear são muito mais comuns quando a SL se manifesta na infância.

Assim, diante da ampla heterogeneidade genética e do curso clínico variável encontrados na SL/SLL, a identificação do defeito genético em cada paciente torna-

se um desafio. Considerando que as encefalopatias mitocondriais da infância, incluindo a SL/SLL, são mais frequentemente causadas por genes nucleares, o estudo por sequenciamento de nova geração utilizando-se painéis ou o estudo de todo o exoma é, atualmente, considerado uma ferramenta mais eficaz na investigação desses pacientes.

Referências

- 1- Goldstein AC, Bhatia P, Vento JM. Mitochondrial disease in childhood: nuclear encoded. *Neurotherapeutics*. 2013; 10(2):212-226. Doi:10.1007/s13311-013-0185-6.
- 2- Ardisson A, Lamantea E, Invernizzi F, Zeviani M, Genitrini S, Moroni I, *et al.* Mitochondrial diseases in childhood. *Current Molecular Medicine*, 2014; 14(8):1069-1078.
- 3- Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatrics Neurology*. 2008 Oct; 39(4):223-35. Doi: 10.1016.
- 4- Ronchi D, Cosi A, Tonduti D, Orcesi S, Bordoni A, Fortunato F, *et al.* Clinical and molecular features of an infant patient affected by Leigh disease associated to m.14459G> A mitochondrial DNA mutation: a case report. *BMC Neurology*. 2011; 11: 85. Published online 2011 Jul 12. Doi: 10.1186/1471-2377-11-85.
- 5- Ruhoy IS, Saneto RP. The genetics of Leigh syndrome and its implication for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics*. 2014; 7:221-234. Doi:10.2147/TACG.S46176.
- 6- Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal Neurosurgical Psychiatry*. 1951; 14:216.
- 7- Baertling F, Rodenburg RJ, Schaper J, Smeitink JA, Koopman WJ, Mayatepek E, *et al.* A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *Journal Neurologic Neurosurgical Psychiatry*. 2014 Mar; 85(3):257-65. Doi: 10.1136/jnnp-2012-304426.
- 8- Naess K, Freyer C, Bruhn H, Wibom R, Malm G, Nennesmo I, *et al.* MtDNA mutations are a common cause of severe disease phenotypes in children with Leigh syndrome. *Biochemical Biophysical Acta*. 2009 May; 1787(5):484-90. Doi: 10.1016/j.bbabi.2008.11.014.
- 9- Rahman S, Block RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, *et al.* Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annual Neurology*. 1996 Mar; 39(3):343-51.
- 10- Zhang Y, Yang YL, Sun F, Cai X, Qian N, Yuan Y, *et al.* Clinical and molecular survey in 124 Chinese patients with Leigh or Leigh-like syndrome. *Journal Inherited Metabolic Disease*. 2007 Apr; 30(2):265. Epub 2007 Feb 24.

- 11- Sofou K, De Coo IFM, Isohanni P, Ostergaard E, Naess K, De Meirleir L, *et al.* A multicenter study on Leigh syndrome: disease course and predictors of survival. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014; 9:52. Doi:10.1186/1750-1172-9-52.
- 12- Gurgel-Giannetti J, Oliveira G, Brasileiro Filho G, Martins P, Vainzof M, Hirano M. Mitochondrial cardioencephalomyopathy due to a novel SCO2 mutation in a Brazilian patient: case report and literature review. *JAMA Neurology*. 2013 Feb; 70(2):258-61. DOI: 10.1001.
- 13- Suomalainen A, Elo JM, Pietiläinen KH, Hakonen AH, Sevastianova K, Korpela M, *et al.* FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurology*. 2011 Sep; 10(9):806-18. Doi: 10.1016/S1474-4422(11)70155-7. Epub 2011 Aug 3.
- 14- Carrozzo R, Dionisi-Vici C, Steuerwald U, Luciola S, Deodato F, Di Giandomenico S, *et al.* SUCLA2 mutations are associated with mild methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness. *Brain*. 2007 Mar; 130(Pt 3):862-74. Epub 2007 Feb 14.
- 15- Arii J, Tanabe Y. Leigh syndrome: serial MR imaging and clinical follow-up. *American Journal Neuroradiology*. Sep. 2000; 21:1502-1509.
- 16- Kinghorn KJ, Kaliakatsos M, Blakely EL, Taylor RW, Rich P, Clarke A, *et al.* Hypertrophic olivary degeneration on magnetic resonance imaging in mitochondrial syndromes associated with POLG and SURF1 mutations. *Journal Neurology*. 2013 Jan; 260(1):3-9. Doi: 10.1007/s00415-012-6564-9.
- 17- Sonam K, Khan NA, Bindu PS, Taly AB, Gayathri N, Bharath MM, *et al.* Clinical and magnetic resonance imaging findings in patients with Leigh syndrome and SURF1 mutations. *Brain & Development*. 2014 Oct; 36(9):807-12. Doi: 10.1016.
- 18- Bindu PS, Taly AB, Sonam K, Govindaraju C, Arvinda HR, Gayathri N, *et al.* Bilateral hypertrophic olivary nucleus degeneration on magnetic resonance imaging in children with Leigh and Leigh-like syndrome. *British Journal Radiology*. 2014; 87:20130478.
- 19- Lebre AS, Rio M, Faivre d'Arcier L, Vernerey D, Landrieu P, Slama A, *et al.* A common pattern of brain MRI imaging in mitochondrial diseases with complex I deficiency. *Journal Medicine Genetic*. 2011 Jan; 48(1):16-23. Doi: 10.1136/jmg.2010.079624. Epub 2010 Oct 23.
- 20- van der Knaap MS, Valk J. Síndrome de Leigh e leucoencefalopatia Mitochondrial. *In: Knaap MS, Valk J. Ressonância magnética da mielinização e dos distúrbios da mielina*. 3. ed., Rio de Janeiro. Ganabara Koogan. 2008, p. 221-225.
- 21- Sofou K, Steneryd K, Wiklund LM, Tulinius M, Darin N. MRI of the brain in childhood-onset mitochondrial disorders with central nervous system involvement. *Mitochondrion*. 2013 Jul; 13(4):364-71. Doi: 10.1016/j.mito.2013.04.008. Epub 2013 Apr 24.

- 22- Horvath R, Kemp JP, Tuppen HA, Hudson G, Oldfors A, Marie SK, *et al.* Molecular basis of infantile reversible cytochrome c oxidase deficiency myopathy. *Brain*. 2009 Nov; 132(Pt 11):3165-74. Doi: 10.1093/brain/awp221. Epub 2009 Aug 31.
- 23- Uusimaa J, Jungbluth H, Fratter C, Crisponi G, Feng L, Zeviani M, *et al.* Reversible infantile respiratory chain deficiency is a unique, genetically heterogenous mitochondrial disease. *Journal Medicine Genetic*. 2011 Oct; 48(10):660-8. Doi: 10.1136/jmg.2011.089995.
- 24- Shibao, S. Análise comparativa entre a dosagem de lactato no liquor e sua detecção através da espectroscopia de prótons por ressonância magnética. Tese (Doutorado em Medicina) - São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.
- 25- Rotig A. Genetics of mitochondrial respiratory chain deficiencies. *Revue Neurology (Paris)*. 2014 May; 170(5):309-22. Doi: 10.1016.
- 26-Saneto RP, Sedensky MM. Mitochondrial disease in childhood: mtDNA encoded. *Neurotherapeutics*. 2013 Apr; 10(2):199-211. Doi: 10.1007/s13311-012-0167-0.
- 27- Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *Journal Inherited Metabolic Disease*. 2015 May; 38(3):437-43. Doi: 10.1007/s10545-015-9823-y. Epub 2015 Mar 4.

6 ARTIGO 3 - VARIABILIDADE FENOTÍPICA INTRAFAMILIAR ASSOCIADA À MUTAÇÃO NOVA NO GENE SUCLA2

6.1 Introdução

A síndrome de Leigh (SL), também conhecida como encefalopatia necrotizante subaguda, foi descrita por Denis Archibald Leigh em 1951¹ e é caracterizada por achados neurorradiológicos típicos incluindo lesões focais, bilaterais e simétricas que acometem mais frequentemente os núcleos da base, os tálamos e o tronco encefálico. Considerando a apresentação clínica, a SL foi classicamente descrita como doença neurodegenerativa, com envolvimento do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP).

Foram propostos os seguintes critérios diagnósticos para SL²: a) doença neurológica progressiva com atraso do desenvolvimento motor e intelectual; b) sinais e sintomas de doença do tronco encefálico e/ou gânglios da base; c) aumento do lactato sérico e/ou do lactato no líquor; d) um ou mais dos seguintes: i) achados característicos da SL à neuroimagem (hipodensidades simétricas nos gânglios da base à tomografia computadorizada ou lesões hiperintensas em sequências ponderadas em T2 à ressonância magnética de encéfalo; ii) alterações neuropatológicas típicas *postmortem*; iii) neuropatologia típica em um irmão com quadro clínico semelhante. Definiram como síndrome de Leigh-like (SLL) aqueles pacientes que apresentavam fortes achados clínicos, laboratoriais e de imagem, mas não podiam ser incluídos nos critérios estritos citados, devido à neuropatologia atípica.

A incidência estimada da SL é de 1:40.000 nascidos vivos^{3,4,5}. Entretanto, a variante Faroe, descrita primeiramente na população das Ilhas Faroe, tem incidência de 1:1.700 nascidos vivos⁶, com efeito fundador e frequência de portador correspondente a 1:25. Nessa forma da SL, os pacientes manifestam encefalomiopatia, surdez neurosensorial e discreta acidúria metilmalônica associada à mutação no gene SUCLA2. Epilepsia é manifestação clínica rara nessa variante. A manifestação inicial mais frequente é a hipotonia muscular entre o nascimento e os cinco meses de idade. Os pacientes geralmente perdem o sustento cefálico e o controle de tronco e usualmente não adquirem capacidade de marcha. É

comum apresentarem grave retardo do crescimento, com necessidade de alimentação por gastrostomia. Outra manifestação comum são infecções respiratórias de repetição. Até o momento, descreveram-se 30 pacientes de diversas etnias com a mutação no gene *SUCLA2*⁷, incluindo faroesa, italiana, romena e mulçumana.

A SL e a SLL são consideradas um desafio à prática clínica devido à sua enorme heterogeneidade clínica e genética. Podem ocorrer como consequência de disfunção da cadeia respiratória (CR) mitocondrial, incluindo os complexos I, II, IV e V, deficiência da coenzima Q 10 (CoQ10) ou associadas a defeito do complexo da piruvato desidrogenase. Até o momento, já foram descritas mutações em mais de 50 genes, nucleares ou mitocondriais, responsáveis por causar essas condições⁸. Diante de tamanha heterogeneidade genética, o aconselhamento genético tornou-se tarefa difícil, uma vez que diferentes tipos de herança podem estar envolvidos, como herança autossômica recessiva, ligada ao cromossomo X e herança materna.

Atualmente, o sequenciamento de nova geração (SNG) tem sido considerado uma excelente ferramenta para obter as regiões codificadoras (exoma) do genoma humano. Essa metodologia propicia muitas vantagens em relação às outras, uma vez que permite aumento da velocidade e redução do preço da análise do genoma humano. O SNG criou perspectivas para o uso do sequenciamento do exoma como uma ferramenta clínica para descoberta de defeitos genéticos em doenças de herança mendeliana⁹. Mais recentemente vem sendo utilizada no estudo de doenças genéticas que apresentam grande heterogeneidade genética, com grande aplicação nas doenças mitocondriais.

Será relatado o uso do sequenciamento do exoma na abordagem diagnóstica de dois irmãos brasileiros, filhos de casal consanguíneo, com diagnóstico de SL, nos quais foi identificada uma mutação em homozigose ainda não descrita no gene *SUCLA2*. Também será descrita a variabilidade fenotípica entre os dois irmãos, ressaltando-se que o mais velho apresentou fenótipo mais leve.

6.2 Pacientes e métodos

6.2.1 Pacientes

O caso-índice é um menino brasileiro, filho mais novo de um casal jovem consanguíneo (primos de segundo grau). Após gestação sem intercorrências, nasceu de parto vaginal com 39 semanas de idade gestacional. O peso ao nascimento foi de 3.210 gramas e comprimento de 49 centímetros. Obteve nota de apgar 9 no primeiro minuto e 10 no quinto minuto. Durante o primeiro ano de vida a criança manifestou hipotonia e atraso do desenvolvimento motor, obtendo sustento cefálico aos 10 meses. Aos três anos de idade foi capaz de sentar-se. Com essa mesma idade foi avaliado pela primeira vez no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG). Apresentava déficit ponderoestatural, ausência de fala, hipotrofia muscular global, hipotonia axial associada à hipertonia apendicular e reflexos tendíneos vivos globalmente. Foram notados movimentos involuntários como coreia e distonia, em moderada intensidade. O paciente não apresentava capacidade de deambulação.

Os exames complementares revelaram acidose láctica e moderada elevação dos níveis de creatinoquinase (CK) no sangue. A dosagem quantitativa de aminoácidos e o perfil de acilcarnitina foram normais, em sangue. A avaliação oftalmológica revelou vasos de calibres reduzidos e alterações retinianas sugestivas de distrofia de retina. Não foi possível realizar avaliação auditiva.

A ressonância magnética de encéfalo (RME) acusou aumento de sinal nos núcleos caudado e putâmen, bilateralmente, nas sequências ponderadas em T2 e *fluid attenuation inversion recovery* (FLAIR), mostradas na Figura 2. O estudo de condução nervosa e eletromiografia não mostraram anormalidades.

Na história familiar, a mãe teve sete gestações, entre as quais três terminaram em abortos espontâneos. O casal tem duas filhas híginas e um outro filho com manifestações clínicas semelhantes às descritas anteriormente. A primeira avaliação desse outro filho no HC-UFMG foi aos quatro anos de idade. Ele apresentava *failure*

to thrive, atraso do desenvolvimento motor, hipotrofia muscular global, hipotonia global, distonia moderada e coreia. Era capaz de colocar-se em ortostatismo e deambular com apoio. A avaliação laboratorial de rotina apurou acidose láctica e moderado aumento de CK. Não houve aumento do nível de alanina sérica. A avaliação oftalmológica também detectou vasos de calibres reduzidos e anomalias sugestivas de distrofia retiniana. A avaliação da audição mostrou surdez neurossensorial grave, bilateral. À RME constataram-se atrofia cortical leve, *cavum* de septo pelúcido e discreto aumento de sinal na sequência ponderada em T2 nos núcleos da base, bilateralmente. O estudo por espectroscopia de prótons notificou duplo pico de ácido láctico no sistema ventricular.

Os dois irmãos foram acompanhados no Ambulatório de Doenças Neuromusculares HC-UFG ao longo de seis anos e, durante esse período, fizeram uso de reposição oral de bicarbonato de sódio e vitaminas (L-carnitina, riboflavina e tiamina). O caso-índice mostrou curso progressivo da distonia. Na época da última consulta, ele estava com oito anos de idade e necessitava de cadeira de rodas para se locomover, sem adquirir a capacidade de deambular com ou sem apoio. O irmão mais velho evoluiu com curso estável, com discreta melhora neurológica. Aos 10 anos ele era capaz de deambular sem apoio, mantinha contato visual e comunicava-se por meio de sinais manuais.

6.3 Cromatografia gasosa de ácidos orgânicos/ espectrometria de massa (CG-EM)

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia gasosa/espectrometria de massa em amostra de urina de cada um dos irmãos.

No caso-índice foram observados excreção elevada de lactato, ácidos 3-OH-butírico e 2-OH-butírico; moderado aumento da excreção do ácido 3-OH-isovalérico e intermediários do ciclo de Krebs e discreto aumento da excreção dos ácidos metilmalônico e metilcítrico. Essa análise foi realizada quando o paciente tinha sete anos de idade e fazia uso de vitaminas (L-carnitina, riboflavina e CoQ10).

O irmão mais velho foi submetido à análise dos ácidos orgânicos em dois momentos diferentes. Na primeira vez ele estava com quatro anos de vida e apresentou elevada excreção de lactato, do ácido 3-OH-butírico; moderado aumento da excreção do ácido 2-OH-butírico e de intermediários do ciclo de Krebs; e discreto aumento da excreção dos ácidos metilmalônico, metilcítrico, 3-OH- isovalérico e 3-OH-isopropiônico. Na segunda dosagem o paciente estava com 10 anos de vida, fazia uso de vitaminas e o perfil de ácidos orgânicos revelou discreto aumento na excreção dos ácidos metilmalônico, metilcítrico, 3-OH-isovalérico e de intermediários do ciclo de Krebs.

6.4 Estudo muscular histoquímico

A biópsia muscular foi obtida do irmão mais velho e mais colaborativo, o que permitiu realizar o procedimento sob anestesia local, evitando-se anestesia geral. O fragmento de musculoesquelético foi retirado do bíceps braquial e os estudos histológico e histoquímico foram realizados conforme protocolo padrão.

A biópsia muscular revelou achados miopáticos com proliferação mitocondrial e ausência de fibras COX negativas à avaliação histoquímica. Apresentava também discreto acúmulo de lipídio e glicogênio em algumas fibras musculares.

6.5 Análise genética

O DNA dos dois pacientes e de seus pais foi extraído do sangue periférico, utilizando-se protocolos-padrão. Mutações comuns do DNA mitocondrial relacionadas à SL foram excluídas, tais como 3243A>G, 8344A>G, 8993T>C, 8993T>G e 1644T>G.

O sequenciamento de todo o exoma dos dois irmãos e de seus pais foi realizado a partir de DNA genômico extraído de sangue periférico utilizando-se o *kit Agilent Human All Exons* 50 Mb e o sequenciador SOLID 5500xl.

Realizada a análise dos dados de exoma e após excluídos 32 genes relacionados à SL, identificou-se a mutação não sinônima 998A>G no gene SUCLA2 presente em homozigose nos dois irmãos e em heterozigose nos pais.

Foram desenhados *primers* para a região codificadora do exon 8 do gene SUCLA, que permitiu a confirmação da mutação por metodologia tradicional (Sanger).

Estudo de depleção do DNA mitocondrial em amostras de tecido muscular do irmão mais velho (que já havia sido submetido à biópsia muscular), a partir de técnica de *Real Time PCR*, no Laboratório de Doenças Mitocondriais da Columbia University (Prof. Salvatore DiMauro & Michio Hirano), revelou depleção de 80% do DNA mitocondrial, compatível com síndrome de depleção do DNA mitocondrial.

6.6 Discussão

A SL e a SLL apresentam achados neurorradiológicos característicos que consistem em lesões focais, bilaterais e simétricas que acometem mais frequentemente os gânglios da base, tálamos e tronco encefálico. Diferentes genes estão associados a essas condições, incluindo genes mitocondriais e genes nucleares. O caso-índice aqui descrito apresentou anormalidades clínicas e neurorradiológicas sugestivas de SL. A história familiar revelou consanguinidade entre os pais, duas irmãs hígdas e um irmão com comprometimento neurológico semelhante. Baseado nesses achados, supôs-se que o defeito genético poderia ser uma mutação em gene nuclear com herança recessiva. O sequenciamento do exoma foi realizado e diferentes ferramentas foram utilizadas para analisar os dados, incluindo um novo *software* desenvolvido chamado Mendel, MD. Foram excluídas mutações em 32 diferentes genes relacionados à SL e à SLL e identificada a mutação 998A>G no exon 8 do gene SUCLA2.

As mutações identificadas no gene SUCLA2, até o momento, estavam espalhadas em diferentes regiões do gene, incluindo os éxons 3, 4, 6 e 7. A mutação 998A>G é nova, ainda não descrita na literatura, e encontra-se no éxon 8, região do gene SUCLA2 onde ainda não foram detectadas mutações. Trata-se de mutação *missense* que leva à troca de uma asparagina por uma glicina na posição 333 da

proteína. Essa mutação foi encontrada em homozigose nos dois irmãos sintomáticos e em heterozigose nos pais assintomáticos, mostrando um padrão de segregação entre os membros da família. A análise do estado de conservação desse aminoácido demonstrou que este é altamente conservado entre as diferentes espécies. Todos esses achados sugerem que essa mutação é patogênica.

O gene SUCLA2 é um dos genes associados à síndrome de depleção do DNA mitocondrial e tem como função participar da manutenção do *pool* de dinucleotídeos necessários para a replicação do DNA mitocondrial. Diferentes genes foram associados a essa síndrome, gerando fenótipos clínicos diferentes: gene TK2 associa-se a quadro miopático, genes DGUOK e POLG associam-se a formas hepatocerebrais e os genes SUCLA2, SUGL1 a formas encefalomiopáticas. Assim, a fim de reforçar a patogenicidade dessa mutação foi realizado também o estudo de depleção do DNA mitocondrial que estava alterado no irmão mais velho, com depleção de 80% do DNAmít, o que é compatível com a síndrome de depleção do DNA mitocondrial¹⁰.

A SL relacionada à mutação no gene SUCLA2 foi descrita em 2005¹¹. Foi designada como variante Faroe devido ao fato de ter sido encontrada pela primeira vez na população das Ilhas Faroe, com incidência de 1:1.700 associada a efeito fundador e frequência de portador de 1:25. Nessa forma, os pacientes manifestam encefalomiopatia, surdez neurossensorial e discreta acidúria metilmalônica. O estudo atual obteve acidúria metilmalônica nos dois irmãos, conforme descrito no trabalho de Elpeleg¹¹, mostrando que esse achado, juntamente com um quadro clínico compatível, pode ser um indício para triagem de mutações no gene SUCLA2.

Em 2009 foi avaliado o curso clínico de 16 pacientes de uma comunidade faroesa que apresentavam uma mutação em homozigose em região de *splice* alternativo (c.543+1>.A no gene SUCLA2)¹². Nenhum desses pacientes era capaz de sentar ou colocar-se em ortostatismo sem apoio. Considerando o fenótipo clínico dos irmãos avaliados no presente estudo, o caso-índice apresentou as manifestações clássicas relacionadas àquelas descritas em pacientes com mutações no gene SUCLA2, evoluindo com curso progressivo da doença e com piora da distonia. Em contrapartida, o irmão mais velho teve discreto fenótipo e aos 10 anos de idade

ainda era capaz de deambular sem apoio; exibia discreta distonia e coreia. De forma semelhante ao quadro clínico, os exames de ressonância magnética do encéfalo também acusaram diferença significativa com alterações discretas no exame do irmão mais velho e envolvimento extenso dos núcleos da base no exame no caso-índice. O fenótipo do irmão mais velho é relevante, uma vez que amplia o espectro de manifestações clínicas associado ao gene *SUCLA2*, ressaltando a possibilidade de existência de formas clínicas mais leves.

Tendo-se que os irmãos portam a mesma mutação no gene *SUCLA2*, pode-se excluir uma influência da idade e tempo de evolução da doença, alterando a apresentação clínica, uma vez que o irmão mais velho manteve quadro clínico mais leve. Fatores ambientais também podem ser excluídos, uma vez que os irmãos estão expostos ao mesmo ambiente. Assim, essa variabilidade intrafamiliar pode ser um indício de que fatores individuais, possivelmente fatores genéticos modificadores, podem estar relacionados na determinação da gravidade do fenótipo. Esses resultados demonstraram a grande importância da utilização do sequenciamento do exoma em doenças como a SL, que pode ser causada por mutações em um número cada vez maior de genes, tanto mitocondriais quanto nucleares. Essa técnica tem sido excelente ferramenta diagnóstica, com custo cada vez mais acessível e até inferior ao de pesquisa de diversos genes pelo método convencional utilizando o sequenciamento Sanger⁹.



Figura 1- A: fenótipo clínico do caso-índice de SL; B: fenótipo clínico do irmão mais velho.
Fonte: da autora.

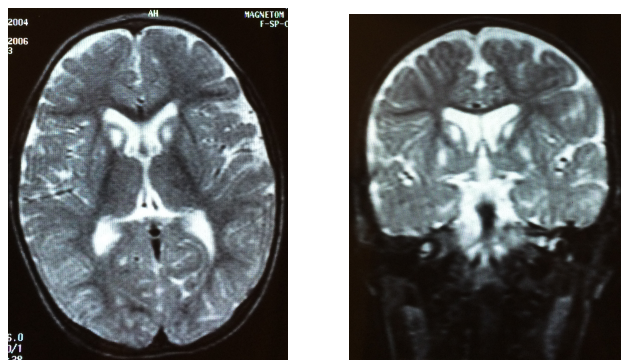


Figura 2 - RME caso-índice de SL: corte axial e corte coronal, sequência ponderada em T2, revelando sinal hiperintenso no núcleo caudado e putâmen, bilateralmente.
Fonte: da autora.

Referências

1. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal Neurosurgical Psychiatry*. 1951; 14:216.
2. Rahman S, Block RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, *et al*. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annual Neurology*. 1996 Mar; 39(3):343-51.
3. Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatric Neurology*. 2008 Oct; 39(4):223-35. Doi: 10.1016.
4. Ronchi D, Cosi A, Tonduti D, Orcesi S, Bordoni A, Fortunato F, *et al*. Clinical and molecular features of an infant patient affected by Leigh disease associated to m.14459G> A mitochondrial DNA mutation: a case report. *BMC Neurology*. 2011; 11: 85. Published online 2011 Jul 12. Doi: 10.1186/1471-2377-11-85.
5. Ruhoy IS, Saneto RP. The genetics of Leigh syndrome and its implication for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics*. 2014; 7:221-234. Doi:10.2147/TACG.S46176.
6. Ostergaard E, Hansen FJ, Sorensen N, Duno M, Vissing J, Larsen PL, *et al*. Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations. *Brain*. 2007 Mar; 130(Pt 3):853-61. Epub 2007 Feb 7.
7. Lamperti C, Fang M, Invernizzi F, Liu X, Wang H, Zhang Q, *et al*. A novel homozygous mutation in SUCLA2 gene identified by exome sequencing. *Molecular Genetics Metabolism*. 2012 Nov; 107(3):403-8. Doi: 10.1016/j.ymgme.2012.08.020. Epub 2012 Sep 7.
8. Lake NJ, Bird MJ, Isohanni P, Paetau A. Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *Journal Neuropathology & Experimental Neurology*. 2015 Jun; 74(6):482-92. Doi: 10.1097.

9. Wortmann SB, Koolen DA, Smeitink JA, van den Heuvel L, Rodenburg RJ. Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *Journal Inherited Metabolic Disease*. 2015 May; 38(3):437-43. Doi: 10.1007/s10545-015-9823-y. Epub 2015 Mar 4.
10. El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial DNA depletion syndromes: Review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics*. 2013; 10:186–198. Doi 10.1007/s13311-013-0177-6.
11. Elpeleg O, Miller C, HersHKovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, *et al*. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *American Journal Human Genetic*. 2005 Jun; 76(6):1081-6. Epub 2005 Apr 22.
12. Morava E, Steuerwald U, Carrozzo R, Kluijtmans LA, Joensen F, Santer R, *et al*. Dystonia and deafness due to SUCLA2 defect; clinical course and biochemical markers in 16 children. *Mitochondrion*. 2009 Nov; 9(6):438-42. Doi: 10.1016/j.mito.2009.08.003. Epub 2009 Aug 8.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síndrome de Leigh é a forma mais comum de doença mitocondrial que tem manifestação inicial na infância, com raros relatos de manifestação tardia, na adolescência ou na vida adulta. Ao longo dos anos, diante da extensa variabilidade de apresentações clínicas e do aprimoramento de técnicas de exames de imagem e de exames moleculares, foram realizados estudos na tentativa de correlacionar as manifestações clínicas e os defeitos genéticos subjacentes. Até o presente momento, porém, não existem estudos que permitam estabelecer estreita relação entre fenótipo e genótipo. Atualmente já foram descritas mutações em mais de 50 genes diferentes, nucleares e mitocondriais, revelando a grande heterogeneidade genética da SL e SLL.

Este estudo foi uma etapa inicial da caracterização clínica e molecular dos pacientes com SL atendidos no HC-UFMG. O estudo molecular foi iniciado pelo estudo das mutações mais frequentes do DNA mitocondrial (3243A>G; 8344A>G; 8993T>G; 8993T>C; 1644T>G) e que se associam ao fenótipo da SL/SLL. No entanto, com a grande evolução das técnicas de biologia molecular, a partir do desenvolvimento do sequenciamento de nova geração, tornou-se necessário iniciar o uso da pesquisa do exoma na avaliação dos pacientes com SL/SLL. Assim, nesta casuística os pacientes 6 e 7, que são irmãos, e o paciente 15 foram submetidos a esta análise.

Foi identificada entre os irmãos uma nova mutação em homozigose no gene SUCLA2, como apresentado no artigo 3. No paciente 15, o estudo de exoma apurou duas mutações em heterozigose composta em um gene recentemente associado a SL/SLL. Essas mutações já foram confirmadas por Sanger e serão avaliadas quanto à sua segregação nos pais.

Portanto, o estudo molecular dos pacientes com SL/SLL continuará dentro de uma linha de pesquisa que consiste na caracterização molecular das doenças mitocondriais, com a utilização de sequenciamento de nova geração. Ressalta-se, ainda, que este é um estudo pioneiro em nosso meio.

APÊNDICE E ANEXO**APÊNDICE A - Ficha clínica de avaliação de pacientes com síndrome de Leigh**

<u>Ficha Clínica - Pacientes com síndrome de Leigh</u>	
<u>Ambulatório Neurogenética – HC UFMG</u>	
Nome:	Registro:
Idade:	DN:
Nome da mãe:	
Nome do pai:	
Telefones:	
História gestacional:	
História familiar: consanguinidade () sim () não	
História pregressa:	
Primeiros sintomas:	
Idade ao diagnóstico:	
<u>Exames</u>	
Biópsia muscular ():	
RM encéfalo ():	
Avaliação molecular ():	
Lactato sérico ():	
Ácidos orgânicos na urina ():	
<u>Outros exames</u>	
Avaliação oftalmológica ():	
ENMG ():	
Audiometria ():	
Liquor ():	

Ecocardiograma ()::

Exame físico

Peso: Estatura:

Ectoscopia: TQT ()sim ()não

Dismorfismos faciais:

Hisurtismo:

Marcha:

Equilíbrio:

FM:

Coordenação motora:

ROT:

RCP:

Tônus:

Trofismo:

NNCC: MOE:

 Ptose palpebral:

 Mímica facial

Observações:

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

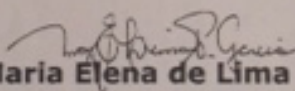
Parecer nº. ETIC 413/04

Interessada: Profa. Dra. Juliana Gurgel Giannetti
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 13 de outubro de 2004, o projeto de pesquisa intitulado « **Caracterização do Fenótipo Clínico, Bioquímico e do Genótipo em Pacientes Portadores de Doenças Mitocondriais** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Prédio da Reitoria – 7º andar sala: 7018 - 31.270-901 – BH - MG
(31) 3499-4592 - FAX: (31) 3499-4027 - coep@prpq.ufmg.br