

## **CARACTERIZAÇÃO DE MIOPATIAS MITOCONDRIAIS ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO ENERGÉTICO**

*FÁBIO CESAR PEDROSO\**, *ANNIBAL P. CAMPELLO\**,  
*LINEU CESAR WERNECK\*\**, *MARIA LÚCIA W. KLÜPPEL\**.

---

**RESUMO** - Foi determinada a atividade das enzimas NADH desidrogenase, NADH citocromo c redutase, succinato desidrogenase, succinato citocromo c redutase, citocromo c oxidase e citrato sintase em mitocôndrias de músculo esquelético humano normal e doente (suspeito de miopatia mitocondrial). O grupo controle foi constituído de 13 indivíduos normais e que não faziam uso contínuo de fármacos. O grupo doente era constituído de 10 pacientes cujo diagnóstico anatomopatológico indicava suspeita de miopatia mitocondrial. Observou-se redução na atividade das enzimas em todos os pacientes: 7 com anormalidades em todas as enzimas ensaiadas; 2 com deficiências em todas as enzimas exceto na citocromo c oxidase; e 1 paciente com disfunção apenas na atividade da succinato desidrogenase e succinato citocromo c redutase. Este perfil possibilitou caracterizar múltiplas deficiências ou deficiência combinada da cadeia respiratória, além da disfunção na citrato sintase em 9 pacientes. Um dos casos constituiu exceção, sendo a deficiência enzimática restrita ao complexo II. Foi possível concluir que a metodologia usada é adequada e facilmente aplicável aos objetivos clínicos. Os resultados obtidos possibilitam a caracterização dos complexos enzimáticos mitocondriais deficientes, mostrando que tais enfermidades são originadas de disfunção no metabolismo energético.

**PALAVRAS-CHAVE:** mitocôndria, músculo esquelético humano, miopatia mitocondrial, NADH desidrogenase, NADH citocromo c redutase, succinato desidrogenase, succinato citocromo c redutase, citocromo c oxidase, citrato sintase.

### **Characterization of mitochondrial myopathies through the evaluation of the enzymatic activities involved in the energetic metabolism**

**ABSTRACT**- The activities of the enzymes NADH dehydrogenase, NADH cytochrome c reductase, succinate dehydrogenase, succinate cytochrome c reductase, cytochrome c oxidase and citrate synthase in normal and sick human skeletal muscle mitochondria were determined. A control group was formed by 13 normal people and without using continuous medication. The patient group was formed by 10 people whose pathological diagnosis indicated suspicion of mitochondrial myopathy. A decrease in the activity of the enzymes in all patient was observed: 7 with abnormality in all the tested enzymes; 2 with deficiencies in all the enzymes except cytochrome c oxidase; and 1 with dysfunction only in the activities of succinate dehydrogenase and succinate cytochrome c reductase. The results indicate multiple or combined deficiencies in the respiratory chain, besides dysfunction of citrate synthase in 9 patients. In one exceptional case, the enzymatic deficiency was restricted to complex II. It is possible to conclude that the methodology used herein is adequate and easily applicable to clinical objectives, and that the results obtained allow characterization of the deficient mitochondrial enzymatic complexes, thus showing that the origin of the diseases is an energetic metabolic dysfunction.

**KEY WORDS:** mitochondria human skeletal muscle, mitochondrial myopathy, NADH cytochrome c reductase, NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, succinate cytochrome c reductase, cytochrome c oxidase citrate synthase.

---

Departamento de Bioquímica\* e de Clínica Médica\*\* da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Estudo realizado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Proc. n° 52.1478/96, 30.0738/87). Aceite: 15-janeiro-1997.

Dr. Annibal P. Campello - Departamento de Bioquímica, UFPR - Caixa Postal 19046 - 81531-990 Curitiba PR - Brasil.

As doenças mitocondriais têm sido reconhecidas por muitos anos, iniciando-se com o estudo pioneiro de Luft et al.<sup>12</sup> em 1962, quando foi diagnosticado hipermetabolismo em uma mulher, devido a deficiência no acoplamento oxidação-fosforilação, em mitocôndrias de músculo. Geralmente, pacientes com doenças mitocondriais exibem desordens nos tecidos com alta demanda aeróbica, isto é, cérebro, músculo esquelético e coração. Os sintomas são variados, com os pacientes frequentemente apresentando cardiopatias ou doenças generalizadas do músculo, fígado e/ou rins<sup>3</sup>. Defeitos na cadeia respiratória são reconhecidos como causas importantes das doenças mitocondriais. Deficiências múltiplas, bem como as deficiências isoladas dos complexos I-IV têm sido descritas<sup>4,6</sup>. A caracterização das miopatias mitocondriais por critérios morfológicos não é apropriada, por diversas razões<sup>5</sup>: 1) anormalidades morfológicas não distinguem as diferentes miopatias mitocondriais; 2) anormalidades morfológicas das mitocôndrias não são restritas a síndromes resultantes de erros primários do metabolismo mitocondrial; 3) alterações morfológicas mitocondriais são escassas em pacientes com erros definidos no metabolismo mitocondrial, tais como, deficiências da carnitina palmitoil-transferase ou deficiências da desidrogenase pirúvica. Um diagnóstico mais preciso pode ser feito por análise bioquímica dos tecidos envolvidos. A determinação das atividades enzimáticas mitocondriais em músculo esquelético humano, obtido por biópsia, pode propiciar um método alternativo de diagnóstico, preciso e específico, além de permitir caracterizar os complexos enzimáticos deficientes.

O presente estudo estabelece as atividades enzimáticas normais em um grupo controle e relata 10 casos de pacientes cujos diagnósticos anatomopatológicos indicavam suspeitas de miopatias mitocondriais. Foram determinadas as atividades enzimáticas ligadas à cadeia respiratória: NADH desidrogenase, NADH citocromo c redutase, succinato citocromo c redutase, citocromo c oxidase, além das enzimas citrato sintase e succinato desidrogenase, do ciclo do ácido cítrico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Obtenção de tecido muscular esquelético humano para isolamento de mitocôndrias.* Amostras de quadríceps e biceps (0,1 a 0,4 g), oriundas de pacientes de ortopedia e traumatologia (grupo controle) ou de suspeitos de miopatias mitocondriais, foram obtidas por biópsia, sob anestesia local, peridural ou raquideana. Imediatamente após a biópsia, a peça foi lavada com soro fisiológico gelado e rapidamente armazenada em nitrogênio líquido, no máximo até 7 dias após a coleta do material. A retirada de tecido muscular ocorreu imediatamente após a indução anestésica. O tempo decorrido, entre a retirada do tecido e o seu armazenamento, não ultrapassou 10 minutos. Tal procedimento visa evitar a degradação proteolítica das enzimas<sup>9,19</sup>. A escolha do quadríceps ou biceps é justificada pelo fato de que, nestes músculos, há predominância de fibras do tipo I (aeróbicas) em relação às fibras do tipo II (anaeróbicas). Nenhum dos indivíduos (grupo controle ou doentes) estava usando qualquer tipo de medicação de uso prolongado e contínuo quando da intervenção cirúrgica.

*Isolamento de mitocôndrias de músculo esquelético humano.* Mitocôndrias de músculo esquelético humano foram isoladas de acordo com o método descrito por Jung et al.<sup>8</sup>, usando-se o meio de extração contendo: D-manitol 250,0 mM, HEPES 10,0 mM (pH 7,2), EGTA 1,0 mM e BSA 0,1%. O músculo (0,1 a 0,4g) foi descongelado em meio de extração gelado, finamente picado com bisturi e homogeneizado em homogeneizador van Potter. O homogeneizado foi então centrifugado a 490xg a 2°C por 10 minutos, a fim de eliminar os restos de células intactas, membranas e núcleos. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi centrifugado a 9.480xg a 2°C durante 15 minutos. O sedimento obtido, constituído de mitocôndrias intactas, foi ressuspenso em meio de extração e armazenado em nitrogênio líquido.

*Obtenção de mitocôndrias rompidas de músculo esquelético humano.* Mitocôndrias intactas foram congeladas em nitrogênio líquido por aproximadamente 3 horas, descongeladas rapidamente e recongeladas; esta operação foi repetida 3 vezes, em intervalos de 30 minutos, sendo finalmente conservadas em banho de gelo, durante a realização dos experimentos.

*Determinação das atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo energético.* As atividades enzimáticas foram determinadas em mitocôndrias rompidas utilizando-se espectrofotômetro Gilford modelo 252, acoplado a registrador. O volume final do meio de reação foi sempre de 1,0 ml, utilizando-se cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico. A temperatura do sistema foi mantida em 28°C por banho-maria termostaticado.

*Citocromo c oxidase* (EC 1.9.3.1) - A atividade foi determinada segundo o método descrito por Mason et al.<sup>13</sup>. O sistema de reação continha: tampão fosfato 50,0 mM (pH 7,4), EDTA 2,0 mM, ferrocitocromo c 30,0  $\mu$ M e aproximadamente 20,0  $\mu$ g de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de mitocôndria sendo a velocidade de oxidação do ferrocitocromo c acompanhada em 550 nm. A atividade específica foi expressa em nanomoles de citocromo c oxidado por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo c:  $E_{550, \text{red-ox}} = 19 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

*NADH citocromo c redutase* (E.C. 1.6.99.3) - A atividade foi determinada segundo o método descrito por Somlo<sup>20</sup>. O sistema de reação continha: tampão fosfato 50,0 mM (pH 7,4), EDTA 2,0 mM, NADH 50,0  $\mu$ M, ferricitocromo c 40,0  $\mu$ M, NaCN 1,0 mM e aproximadamente 20,0  $\mu$ g de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de mitocôndria sendo a velocidade de redução do ferricitocromo c acompanhada a 550 nm. A atividade específica foi expressa em nanomoles de citocromo c reduzido por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo c.

*NADH desidrogenase* (E.C. 1.6.99.3) - A atividade foi determinada segundo o método descrito por Singer<sup>18</sup>. O sistema de reação continha: tampão fosfato 50,0 mM (pH 7,4), EDTA 2,0 mM, NADH 150,0  $\mu$ M, ferricianeto 600,0  $\mu$ M, rotenona 10,0 mM e aproximadamente 20,0  $\mu$ g de proteína mitocondrial. A reação foi iniciada pela adição de mitocôndria sendo a velocidade de redução do ferricianeto acompanhada a 420 nm. A atividade específica foi expressa em nanomoles de ferricianeto reduzido por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ferricianeto:  $E_{420, \text{red-ox}} = 1040 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

*Succinato citocromo c redutase* (E.C. 1.3.99.1) - A atividade foi determinada segundo o método descrito por Somlo<sup>20</sup>. O sistema de reação continha: tampão fosfato 50,0 mM (pH 7,4), EDTA 2,0 mM, succinato de sódio 5,0  $\mu$ M, NaCN 1,0 mM, rotenona 10,0  $\mu$ M e aproximadamente 40,0  $\mu$ g de proteína mitocondrial. A mistura foi incubada com succinato por 5 minutos a 28°C para pré-ativação da enzima, sendo a reação iniciada pela adição do ferricitocromo c 40,0  $\mu$ M. A velocidade de redução do ferricitocromo c foi acompanhada a 550 nm. A atividade específica foi expressa em nanomoles de citocromo c reduzido por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do citocromo c.

*Citrato sintase* (E.C. 4.1.3.7) - A atividade foi determinada segundo o método descrito por Sreer<sup>21</sup>. O sistema de reação continha: ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 100,0  $\mu$ M, acetil CoA 300,0  $\mu$ M e aproximadamente 20,0  $\mu$ g de proteína mitocondrial. A absorção a 412 nm foi acompanhada por 3 minutos para medir a possível desacilação do acetil-CoA, sendo posteriormente a reação iniciada pela adição de 500,0  $\mu$ M de oxaloacetato. A velocidade de formação dos grupos SH livres correspondente ao CoA-SH e sua complexação com o DTNB, gerando um íon mercaptídeo foi monitorada em 412 nm, onde o produto formado apresenta forte absorção. A atividade específica foi expressa em nanomoles de CoA-SH formado por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do íon mercaptídeo:  $E_{412} = 13,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

*Succinato desidrogenase* (E.C. 1.3.99.1) - A atividade foi determinada segundo o método de Singer<sup>18</sup>, utilizando-se 2,6 diclorofenolindofenol (DPIP) e fenazina metassulfato (PMS) como sistema aceptor de elétrons. O sistema de reação continha: tampão fosfato 50,0 mM (pH 7,4), EDTA 2,0 mM, succinato de sódio 20,0 mM, NaCN 1,0 mM, rotenona 10,0  $\mu$ M e aproximadamente 40,0  $\mu$ g de proteína mitocondrial. A mistura foi incubada com succinato de sódio durante 5 minutos a 28 °C para pré-ativação da enzima, sendo a reação iniciada pela adição de DPIP 60,0  $\mu$ M e PMS 1,0 mM. A velocidade de redução do DPIP foi acompanhada em 600 nm. A atividade específica foi expressa em nanomoles de DPIP reduzido por minuto por mg de proteína, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de DPIP reduzido:  $E_{600} = 19 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

*Obtenção do ferrocitocromo c.* Citocromo c bovino foi reduzido com ditionito de sódio e a solução aquosa filtrada em coluna Sephadex G-25, a fim de separar o ferrocitocromo c do excesso de ditionito<sup>22</sup>. A concentração de citocromo c reduzido foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o coeficiente de extinção molar  $27,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para a hemoproteína reduzida.

*Determinação da concentração de proteínas* As concentrações de proteínas das preparações mitocondriais foram determinadas pelo método descrito por Lowry et al.<sup>11</sup>, utilizando-se a soroalbumina bovina como padrão.

*Análise estatística* O parâmetro estatístico empregado na comparação das médias de atividades enzimáticas entre o grupo controle e doentes foi o teste t de Student, para dados não pareados, utilizando-se o nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

O grupo controle foi constituído de 13 indivíduos (9 homens e 4 mulheres) que não apresentavam doenças musculares e com idade entre 11 e 50 anos. Tratava-se de pacientes de ortopedia e traumatologia, mais especificamente com problemas de joelho (rompimento de ligamentos, luxação de patela com entorse) e fratura exposta de fêmur. Nestes casos, em que o tratamento exigia intervenção cirúrgica e que o acesso permitia exposição do quadríceps, foram feitas as biópsias. Com relação ao grupo doente, foram analisados 10 casos (7 homens e 3 mulheres) com idade entre 4 e 50 anos, cujo diagnóstico anatomopatológico indicava suspeita de miopatia mitocondrial.

O teste F, seguido do teste de Tukey, aplicado ao grupo controle, mostrou não haver diferença estatística a nível de 5% de significância nas diferentes atividades enzimáticas, em função dos seguintes parâmetros: sexo, idade e origem do músculo esquelético avaliado (biceps ou quadríceps).

O teste t de Student mostrou diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), na comparação das médias das atividades enzimáticas determinadas entre o grupo controle e cada um dos pacientes.

Nas Tabelas 1 a 6 constam as atividades enzimáticas do grupo controle e dos doentes.

A partir dos resultados apresentados nas Tabelas 1 a 6, pode-se analisar as características do metabolismo mitocondrial de cada paciente.

*Paciente EML.* Apresenta diminuição da atividade das seguintes enzimas: NADH desidrogenase (54,7% do controle), NADH citocromo c redutase (43,8% do controle), succinato desidrogenase (42,4% do controle), succinato citocromo c redutase (31,2% do controle) e citrato sintase (44,5% do controle). A atividade da citocromo oxidase foi normal comparada ao grupo controle. Este perfil permite sugerir deficiências combinadas da cadeia respiratória, a nível dos complexos I e II, além de provável deficiência do complexo III. Por outro lado, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica possíveis anormalidades no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Tabela 1. Comparação da atividade enzimática da NADH desidrogenase entre o grupo controle e doentes.*

Identificação	n	A $\pm$ DP	p
Controle	67	2416 $\pm$ 336	-
EML	5	1322 $\pm$ 32	< 0,05
EST	6	1806 $\pm$ 158	< 0,05
GFT	4	1257 $\pm$ 16	< 0,05
JAS	4	658 $\pm$ 172	< 0,05
JNN	7	1699 $\pm$ 122	< 0,05
JS	3	509 $\pm$ 46	< 0,05
LOL	6	986 $\pm$ 83	< 0,05
PPN	5	993 $\pm$ 77	< 0,05
RF	5	1727 $\pm$ 79	< 0,05
ZS	7	2431 $\pm$ 121	> 0,05

*Tabela 2. Comparação da atividade enzimática da NADH citocromo c redutase entre o grupo controle e doentes.*

Identificação	n	A $\pm$ DP	p
Controle	79	115 $\pm$ 25	-
EML	5	50 $\pm$ 2	< 0,05
EST	5	84 $\pm$ 5	< 0,05
GFT	5	32 $\pm$ 2	< 0,05
JAS	4	47 $\pm$ 11	< 0,05
JNN	5	62 $\pm$ 5	< 0,05
JS	4	11 $\pm$ 1	< 0,05
LOL	5	39 $\pm$ 4	< 0,05
PPN	5	32 $\pm$ 3	< 0,05
RF	6	55 $\pm$ 3	< 0,05
ZS	5	126 $\pm$ 4	> 0,05

n, número de repetições; DP, desvio padrão. A, atividade enzimática específica média (nmoles de ferricianeto reduzido/min x mg de proteína).

n, número de repetições; DP, desvio padrão. A, atividade enzimática específica média (nmoles de citocromo c reduzido/min x mg de proteína).

Tabela 3. Comparação da atividade enzimática da succinato desidrogenase entre o grupo controle e doentes.

Identificação	n	A ± DP	p
Controle	64	110 ± 21	-
EML	5	47 ± 3	< 0,05
EST	5	76 ± 5	< 0,05
GFT	*	*	*
JAS	3	29 ± 5	< 0,05
JNN	4	60 ± 2	< 0,05
JS	3	11 ± 2	< 0,05
LOL	6	19 ± 4	< 0,05
PPN	4	23 ± 2	< 0,05
RF	5	62 ± 2	< 0,05
ZS	6	63 ± 3	< 0,05

n, número de repetições; DP, desvio padrão; \*, atividade enzimática não determinada; A, atividade enzimática específica média (nmoles de DPIP reduzido/min x mg de proteína).

Tabela 5. Comparação da atividade enzimática da citocromo c oxidase entre o grupo controle e doentes.

Identificação	n	A ± DP	p
Controle	78	220 ± 65	-
EML	5	267 ± 13	> 0,05
EST	5	136 ± 12	< 0,05
GFT	3	142 ± 5	< 0,05
JAS	4	45 ± 4	< 0,05
JNN	6	208 ± 5	> 0,05
JS	3	34 ± 3	< 0,05
LOL	5	118 ± 5	< 0,05
PPN	5	124 ± 4	< 0,05
RF	5	161 ± 6	< 0,05
ZS	5	243 ± 8	>0,05

n, número de repetições; DP, desvio padrão; A, atividade enzimática específica média (nmoles de citocromo c oxidado/min x mg de proteína).

Tabela 4. Comparação da atividade enzimática da succinato citocromo c redutase entre o grupo controle e doentes.

Identificação	n	A ± DP	p
Controle	91	91 ± 13	-
EML	5	28 ± 2	< 0,05
EST	5	54 ± 2	< 0,05
GFT	3	13 ± 1	< 0,05
JAS	4	14 ± 3	< 0,05
JNN	6	45 ± 4	< 0,05
JS	3	14 ± 1	< 0,05
LOL	6	22 ± 2	< 0,05
PPN	5	15 ± 1	< 0,05
RF	6	32 ± 3	< 0,05
ZS	5	29 ± 3	< 0,05

n, número de repetições; DP, desvio padrão; A, atividade enzimática específica média (nmoles de citocromo c reduzido/min x mg de proteína).

Tabela 6. Comparação da atividade enzimática da citrato sintase entre o grupo controle e doentes.

Identificação	n	A ± DP	p
Controle	74	237 ± 41	-
EML	6	105 ± 5	< 0,05
EST	4	116 ± 4	< 0,05
GFT	3	82 ± 4	< 0,05
JAS	3	57 ± 2	< 0,05
JNN	6	139 ± 5	< 0,05
JS	3	61 ± 1	< 0,05
LOL	5	61 ± 3	< 0,05
PPN	4	88 ± 4	< 0,05
RF	6	125 ± 6	< 0,05
ZS	6	214 ± 5	>0,05

n, número de repetições; DP, desvio padrão; A, atividade enzimática específica média (nmoles de CoA-SH/min x mg de proteína).

*Paciente EST.* Este paciente apresentou diminuição na atividade de todas as enzimas ensaiadas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, descrito a seguir: NADH desidrogenase (74,7% do controle), NADH citocromo c redutase (72,8% do controle), succinato desidrogenase (69,1% do controle), succinato citocromo c redutase (60% do controle), citocromo c oxidase (61,6% do controle) e citrato sintase (49% do controle). Estes resultados sugerem múltiplas deficiências da cadeia respiratória, a nível dos complexos I, II e IV. No caso do complexo I, o grau de anormalidade foi relativamente baixo, quando comparado aos demais complexos enzimáticos afetados. Uma possível deficiência do complexo III não pode ser comprovada pelos resultados obtidos. Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Paciente GFT.* Este paciente apresentou diminuição na atividade de todas as enzimas ensaiadas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, como mostrado a seguir: NADH desidrogenase (52% do controle), NADH citocromo c redutase (27,8% do controle), succinato citocromo c redutase (13,8% do controle), citocromo c oxidase (64,4% do controle) e citrato sintase (34,7% do controle). Os resultados sugerem deficiências combinadas da cadeia respiratória a nível dos complexos I, III e IV. A indicação de envolvimento do complexo III advém do fato que a atividade da NADH citocromo c redutase (complexos I + III) é significativamente menor que a atividade enzimática da NADH desidrogenase (parte do complexo I). A caracterização de possível disfunção a nível do complexo II, ficou prejudicada pelo fato da atividade da enzima succinato desidrogenase (parte do complexo II) não ter sido determinada. Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Paciente JAS.* Este paciente apresentou diminuição na atividade de todas as enzimas ensaiadas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, como mostrado a seguir: NADH desidrogenase (27,2% do controle), NADH citocromo c redutase (40,8% do controle), succinato desidrogenase (25,9% do controle), succinato citocromo c redutase (15,8% do controle), citocromo c oxidase (20,5% do controle) e citrato sintase (24,1% do controle). Observa-se severa redução em todas as atividades enzimáticas, revelando sério comprometimento do metabolismo energético. É possível sugerir a existência de múltiplas deficiências na cadeia respiratória, a nível dos complexos I, II, e IV. A indicação de deficiência a nível do complexo III não pode ser comprovada pelos resultados obtidos. Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Paciente JNN.* O paciente apresentou diminuição na atividade das várias enzimas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, conforme descrito a seguir: NADH desidrogenase (70% do controle), NADH citocromo c redutase (54,1% do controle), succinato desidrogenase (54,5% do controle), succinato citocromo c redutase (50% do controle) e citrato sintase (58,9% do controle). A atividade da enzima citocromo c oxidase (94,7% do controle) mostrou resultado normal. Este perfil permite sugerir deficiências combinadas da cadeia respiratória, a nível dos complexos I e II. A indicação de possível deficiência no complexo III não pode ser comprovada pelos resultados apresentados. Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico. Deve-se ressaltar também que a caracterização bioquímica deste paciente foi similar à obtida para o paciente EML, ambos apresentando deficiências em todas as enzimas ensaiadas, com exceção da citocromo c oxidase.

*Paciente JS.* O paciente apresentou diminuição nas atividades de todas as enzimas ensaiadas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, como descrito a seguir: NADH desidrogenase (21,1% do controle), NADH citocromo c redutase (9,3% do controle), succinato desidrogenase (10,2% do controle), succinato citocromo c redutase (15,9% do controle), citocromo c oxidase (15,3% do controle) e citrato sintase (26% do controle). A partir destes resultados, fica evidente o sério comprometimento da função mitocondrial neste paciente. Este perfil evidencia a possibilidade de múltiplas deficiências da cadeia respiratória, a nível dos complexos I, II, III e IV. Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Paciente LOL.* O paciente apresentou diminuição nas atividades de todas as enzimas ensaiadas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, como descrito a seguir: NADH desidrogenase

(40,8% do controle), NADH citocromo c redutase (34% do controle), succinato desidrogenase (17,2% do controle), succinato citocromo c redutase (24,6% do controle), citocromo c oxidase (53,8% do controle) e citrato sintase (25,7% do controle). Este perfil permite sugerir deficiências múltiplas na cadeia respiratória, a nível dos complexos I, II, III e IV. Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Paciente PPN.* A paciente apresentou diminuição nas atividades de todas as enzimas ensaiadas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, como descrito a seguir: NADH desidrogenase (41,1% do controle), NADH citocromo c redutase (28% do controle), succinato desidrogenase (20,4% do controle), succinato citocromo c redutase (16,6% do controle), citocromo c oxidase (56,3% do controle) e citrato sintase (37,1% do controle). A partir de tais resultados, fica evidente o sério comprometimento da função mitocondrial neste paciente. Este perfil permite sugerir múltiplas deficiências na cadeia respiratória, a nível dos complexos I, II, III e IV. Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Paciente RF.* O paciente apresentou diminuição nas atividades de todas as enzimas ensaiadas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, como descrito a seguir: NADH desidrogenase (71,5% do controle), NADH citocromo c redutase (48,2% do controle), succinato desidrogenase (56,1% do controle), succinato citocromo c redutase (35% do controle), citocromo c oxidase (73,1% do controle) e citrato sintase (52,7% do controle). Este perfil permite sugerir múltiplas deficiências da cadeia respiratória, a nível dos complexos I, II, III e IV. A indicação de provável envolvimento do complexo III advém do fato que a atividade da NADH citocromo c redutase (complexos I + III) é significativamente menor que a atividade enzimática da NADH desidrogenase (parte do complexo I). Além disso, a deficiência na atividade da enzima citrato sintase indica provável anormalidade no metabolismo oxidativo a nível do ciclo do ácido cítrico.

*Paciente ZS.* A paciente apresentou diminuição nas atividades de apenas duas enzimas, sendo o percentual de atividade remanescente, comparado ao controle, como descrito a seguir: succinato desidrogenase (57,5% do controle) e succinato citocromo c redutase (32,5% do controle). As atividades das demais enzimas investigadas, mostraram-se absolutamente normais. Este perfil permite caracterizar deficiência isolada na cadeia respiratória, a nível do complexo II. Dentre os 10 casos analisados este foi o único em que a disfunção mitocondrial manteve-se restrita a apenas um complexo respiratório, no qual segundo a literatura<sup>1, 14-16</sup> anormalidades são menos frequentes.

## DISCUSSÃO

Alguns pesquisadores têm demonstrado especial preocupação com relação aos cuidados e critérios necessários na condução dos estudos bioquímicos sobre doenças mitocondriais. Estes incluem: seleção de grupo controle apropriado, condições ideais de realização da biópsia e armazenamento da amostra coletada e emprego de metodologia adequada para isolamento e determinação das respectivas atividades enzimáticas. Muitas vezes, a diversidade e a complexidade dos resultados bioquímicos encontrados para uma mesma síndrome clínica, devem-se às diferenças nas técnicas experimentais adotadas.

Na seleção do grupo controle, foram observadas todas as recomendações citadas na literatura. É fundamental que a performance oxidativa das mitocôndrias dos doentes seja comparada com controles apropriados<sup>17</sup>. Por isso, indivíduos com padrão de atividade física semelhante, foram escolhidos para a composição do grupo controle, evitando-se sempre os esportistas.

Os pré-requisitos necessários para que os indivíduos pudessem compor o grupo controle foram: 1) não serem portadores de patologia neuromuscular; 2) não estarem fazendo uso prolongado ou contínuo de fármacos; 3) as cirurgias para correção dos problemas ortopédicos ou de fraturas apresentados pelos pacientes fossem realizadas com anestesia de bloqueio parcial (local, peridural ou raquianestesia), compatíveis com o tipo de anestesia exigido pelo estudo; 4) o acesso cirúrgico

para correção do problema apresentado pelo paciente permitisse a exposição do quadriceps ou biceps, músculos padronizados para o presente estudo.

Especificamente, com relação ao tipo de anestesia, Yorifugi et al.<sup>23</sup> e Zheng et al.<sup>24</sup> discutiram a inviabilidade da realização da biópsia muscular por anestesia geral em tais estudos, mostrando que as atividades enzimáticas em mitocôndrias assim isoladas apresentam valores significativamente mais baixos e com grande dispersão, em comparação às atividades enzimáticas determinadas em mitocôndrias de músculo obtidas por biópsia com anestesia de bloqueio parcial.

Com relação ao isolamento e obtenção de mitocôndrias, levou-se em consideração que o músculo esquelético contém concentração relativamente alta de  $Ca^{2+}$ , o qual pode danificar a mitocôndria durante o isolamento<sup>10</sup>. Para evitar o possível efeito deletério deste íon, a composição dos meios de extração e reação usados continham respectivamente, EGTA e EDTA, conhecidos quelantes de cálcio e íons divalentes.

As mitocôndrias foram rompidas por congelamento e descongelamento em um ciclo de três vezes, conforme preconizado por vários autores<sup>2,7,24</sup>. Este tratamento é necessário, pois mitocôndrias intactas não são permeáveis a substratos como o NADH e outros aceitadores/doadores de elétrons utilizados nos ensaios espectrofotométricos. Além disso, este tratamento evita trauma mecânico à organela, que poderia interferir na atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória. Em especial, o complexo I tem sido considerado menos estável do que o complexo II<sup>14</sup> e altamente suscetível a mudanças físicas proporcionadas por stress mecânico<sup>10</sup>. Quanto à enzima citocromo c oxidase, tem sido descrita como a mais lábil dentre as enzimas da cadeia respiratória sendo o rompimento mecânico prejudicial à atividade do complexo<sup>24</sup>. De acordo com Singer et al.<sup>19</sup>, o erro mais comumente encontrado nos ensaios com a succinato desidrogenase e succinato citocromo c redutase é a falta de pré-ativação das enzimas com o próprio substrato (succinato). A pré-ativação é necessária para remover a presença de quantidades variáveis de oxaloacetato, um inibidor competitivo das enzimas.

A investigação bioquímica realizada neste estudo, revelou-se adequada para o estabelecimento de diagnóstico nosológico preciso e facilmente aplicável aos objetivos clínicos. Os resultados possibilitam ainda a localização de deficiências enzimáticas específicas do metabolismo mitocondrial.

## REFERÊNCIAS

- Behbehani AW, Goebel H, Osse G, Gabriel M, Langenbeck U, Berden J, Berger R, Schutgens RBH. Mitochondrial myopathy with lactic acidosis and deficient activity of muscle succinate cytochrome-c-oxidoreductase. *Eur J Pediatr*. 1984;143:67-71.
- Bindoff LA, Desnuelle C, Birch-Machin MA, Pellissier JF, Serratrice G, Dravet C, Bureau M, Howell N, Turnbull DM. Multiple defects of the mitochondrial respiratory chain in a mitochondrial encephalopathy (MERRF): a clinical, biochemical, and molecular study. *J Neurol Sci*. 1991;102:17-24.
- Capaldi RA. Mitochondrial myopathies and respiratory chain proteins. *TIBS* 1988;13:144-148.
- Cooper JM, Hayes DJ, Chaliss RAI, Morgan-hughes JA, Clark JB. Treatment of experimental NADH ubiquinone reductase deficiency with menadione. *Brain* 1992;115:991-1000.
- Di Mauro S, Bonilla E, Zeviani M, Nakagawa M, De Vivo D. Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol*. 1985;17:521-538.
- Hall RE, Henrikson KG, Lewis SF, Haller RG, Kennaway NG. Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency: abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin Invest*. 1993;92:2660-2666.
- Ichiki T, Tanaka M, Nishirimi M, Suzuki H, Ozawa T, Kobayashi M, Wada Y. Deficiency of subunits of complex I and mitochondrial encephalomyopathy. *Ann Neurol* 1988;23:287-294.
- Jung K, Reinholdt C, Scholz D. Inhibited efficiency of kidney mitochondria isolated from rats treated with ciclosporin A. *Nephron* 1987;45:43-45.
- Kim SJ, Lee KO, Takamiya S, Capaldi RA. Mitochondrial myopathy involving ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase (complex III) identified by immunoelectron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1987;92:270-276.
- Lee CP. Biochemical studies of isolated mitochondria from normal and diseased tissues. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:21-28.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AC, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernester L, Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 1962;41:1776-1804.



13. Mason TL, Poyton RO, Wharton DC, Shatz G. Cytochrome c oxidase from bakers yeast. *J Biol Chem* 1973;248:1346-1354.
14. Riggs JE, Schochet SS Jr., Fakudej AV, Papadimitriou A, Di Mauro S, Crosby TW, Gutmann L, Moxley III RT. Mitochondrial encephalomyopathy with decreased succinate-cytochrome c reductase activity. *Neurology* 1984;34:48-53.
15. Rivner MH, Shamsnia M, Hommes FA. Kearns-Sayre syndrome and complex II deficiency. *Neurology* 1989;39:693-696.
16. Schapira AHV, Cooper JM, Morgan-Hughes JA, Landon DN, Clark JB. Mitochondrial myopathy with a defect of mitochondrial protein transport. *N Engl J Med* 1990;323:37-42.
17. Scholte HR, Agsteribbe E, Busch HFM, Hoogenraad TU, Jennekens FGI, Van Linge B, Luyt-Houwen IEM, Ross JD, Ritters MHJ, Verduin MHM. Oxidative phosphorylation in human muscle in patients with ocular myopathy and after general anaesthesia. *Biochim Biophys Acta* 1990;1018:211-216.
18. Singer TP, Ramsay RR, Ackrell BAC. Deficiencies of NADH and succinate dehydrogenases in degenerative diseases and myopathies. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:211-219.
19. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline and  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase. *Methods Biochem Anal* 1974;22:125-175.
20. Somlo M. Induction des lactico-cytochrome c reductases (D- et L-) de la levure aerobie par des lactates (D- et L-). *Biochim Biophys Acta* 1965;97:183-201.
21. Srere PA. Citrate synthase. *Methods Enzymol* 1969;13:3-11.
22. Yonetani T, Ray GS. Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocytochrome c by cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 1965;240:3392-3398.
23. Yorifuji S, Ogasahara S, Takahashi M, Tarui S. Decreased activities in mitochondrial inner membrane electron transport system in muscle from patients with Kearns-Sayre syndrome. *J Neurol* 1985;71:65-75.
24. Zheng X, Shoffner JM, Voljavec AS, Wallace DC. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. *Biochim Biophys Acta*. 1990.1019:1-10.