**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS**

MARGLEICE MARINHO VIEIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E DE
NEUROIMAGEM DE PACIENTES COM DOENÇA MITOCONDRIAL
ASSOCIADA À MUTAÇÃO m.3243A>G**

**Ribeirão Preto – SP
2016**

MARGLEICE MARINHO VIEIRA ROCHA

**Caracterização clínica, laboratorial e de neuroimagem de pacientes com
doença mitocondrial associada à mutação m.3243A>G**

V.1

Dissertação apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Neurologia e Neurociências Clínicas

Área de Concentração: Doenças Crônico-
Degenerativas e Imunomediadas do Sistema Nervoso
(Doenças Neuromusculares e Neuroimunologia)

Orientador: Profa. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa
Sobreira

**Ribeirão Preto – SP
2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Margleice Marinho Vieira

Caracterização clínica, laboratorial e de neuroimagem de pacientes com doença mitocondrial associada à mutação m.3243A>G. / Margleice Marinho Vieira Rocha; Orientadora Claudia Ferreira da Rosa Sobreira. – São Paulo, 2016.

81f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade de São Paulo, Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento, Programa de Pós-graduação em Neurologia e Neurociências Clínicas. 2016

1. m.3242A>G. 2. MELAS. 3. doenças mitocondriais. 4. DNA mitocondrial. 5. Lesões semelhantes a AVC.

I.Sobreira, Claudia Ferreira da Rosa. II. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Margleice Marinho Vieira Rocha

Caracterização clínica, laboratorial e de neuroimagem de pacientes com doença mitocondrial associada à mutação m.3243A>G.

Dissertação apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Neurologia e Neurociências Clínicas

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura: _____

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura: _____

Prof. Dr.:
Instituição:
Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Percorrer o caminho do conhecimento é uma tarefa árdua que exige perseverança, resiliência e paciência. Por vezes nos deparamos com fontes de frustrações e até mesmo nos perguntamos se não seria a hora de parar, desistir. Afinal, o sofrimento é real! Física e psicologicamente somos postos à prova. Entretanto, também surgem nesse percurso pessoas que nos incentivam a levantar e crescer. São esses grandes mestres que agradeço agora por me ensinarem que uma das funções do conhecimento é encantar as pessoas e, com isso, gerar terreno fértil para que a sociedade se torne melhor.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Claudia Ferreira da Rosa Sobreira, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela confiança e por ter sido minha maior incentivadora. Terei para sempre como um exemplo de professora e de ser humano, pois sempre agiu com ética impecável e com sensibilidade, virtudes tão necessárias atualmente.

Ao Prof^o Dr^o Amilton Barreira Antunes e ao Prof^o Dr^o Wilson Marques Junior por terem contribuído fundamentalmente para minha formação em doenças neuromusculares e neurofisiologia clínica. Tenho pelos senhores grande admiração.

À Dr^a Patricia Toscano Barreto Nogueira Onófre pela amizade e pelo grande carinho com que nos conduziu nas atividades no laboratório de Neurofisiologia Clínica. A senhora é um exemplo de humanidade e simplicidade. Agradeço muito por ter tido oportunidade de conhecer uma pessoa tão iluminada.

Ao Dr^o Charles Marques Lourenço por ser tão especial e ter verdadeira paixão por cuidar de pacientes raros. Obrigados por todo conhecimento que passou a mim e meus colegas.

Aos demais professores e médicos assistentes do serviço de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo suporte e ensinamentos durante minha formação profissional em Neurologia.

À Sirlene e às técnicas do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, Thaísa, Cristina, Silvia, Sandra, Cristina, Giuliana e Aracy, pelo excelente trabalho desenvolvido e pela amizade.

Finalmente, agradeço também aos meus amigos de jornada nesses dois últimos anos durante a realização deste trabalho. Eduardo da Silva Ramos, Paula Marques Lourenço e Pablo

Vinícius Silveira Feitoza, vocês permitiram que essa jornada fosse muito mais suave. Somos fortes hoje porque escolhemos manter a amizade, sinceridade e lealdade. Tenho muito orgulho de tê-los como amigos.

Caracterização clínica, laboratorial e de neuroimagem de pacientes com doença mitocondrial associada à mutação m.3243A>G

RESUMO

INTRODUÇÃO: A forma clássica de encefalomiopatia mitocondrial associada à mutação do DNA mitocondrial m.3243A>G é a *Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes* (síndrome de MELAS). Entretanto, o espectro de manifestações clínicas dos indivíduos que apresentam essa mutação é bastante amplo.

OBJETIVO: Descrever o espectro clínico, laboratorial e de imagem de pacientes com doença mitocondrial decorrente da mutação m.3243A>G.

MÉTODOS: Estudo descritivo retrospectivo de uma série de casos de pacientes com a mutação m.3243A>G em seguimento no ANEM/HCFMRP-USP. Os dados clínicos e informações sobre exames complementares foram coletados através de revisão sistemática dos prontuários médicos dos pacientes selecionados. Os exames de neuroimagem foram revisados juntamente com neurorradiologista experiente para descrição das lesões encontradas.

RESULTADOS: No período compreendido entre maio de 2000 e maio de 2015, a mutação m.3243A>G foi pesquisada em um total de 817 pacientes, em DNA extraído de células do sangue periférico (n= 441), de fragmentos de biópsia de músculo esquelético (n= 293), de ambos (n= 82) e mais raramente de células do sedimento urinário (n=1). Dentre esses, 16 indivíduos de 12 famílias apresentaram a referida mutação, resultando em uma taxa de detecção da mutação de 1,96% nessa população. Foram incluídos no estudo 12 indivíduos de 9 famílias que estavam em seguimento no nosso serviço. Os achados mais comuns nesta série foram em ordem de frequência: sinais de miopatia, transtornos neurocomportamentais, epilepsia, endocrinopatias, ataxia cerebelar, migrânea, episódios semelhantes a AVC, vômitos recorrentes, distúrbios de condução cardíaca, neuropatia periférica e sinais de disautonomia, mioclonias, surdez neurossensorial, cegueira cortical, comprometimento ocular, e proteinúria. Em nossa série, identificamos que cinco pacientes foram classificados com a forma clássica de MELAS, dois apresentaram CPEO associada a outros sintomas como transtornos psiquiátricos e diabetes mellitus. Os demais pacientes apresentavam características clínicas que não configuravam uma síndrome clínica definida. Além das lesões semelhantes a AVC, as lesões reveladas por neuroimagem mais frequentes nessa população foram alteração de sinal dos núcleos da base, atrofia encefálica e alteração de sinal da substância branca, sendo igualmente prevalentes entre os pacientes com a síndrome clássica de MELAS e os pacientes que não apresentaram lesões semelhantes a AVC. Dos pacientes com MELAS, 100% apresentaram pico anômalo de lactado e 60% redução do NAA à espectroscopia de prótons; enquanto que entre os pacientes sem lesões semelhantes a AVC essas alterações foram encontradas em dois e em um paciente

respectivamente. Nós identificamos o achado inédito de azoospermia associada à mutação m.3243A>G. Essa é a maior série de casos de pacientes brasileiros com a mutação m.3243A>G até o momento.

CONCLUSÃO: O amplo espectro de apresentação clínica e de neuroimagem é uma característica notável entre os pacientes com a mutação m.3243A>G do DNAm. Essa desordem deve ser considerada em pacientes com evidência de sinais e sintomas que sugiram acometimento multissistêmico.

Palavras-Chave: m.3242A>G, MELAS, miopatias mitocondriais, DNA mitocondrial, neuroimagem, lactato, lesões semelhantes a AVC.

Clinical, laboratory and neuroimaging features of patients with mitochondrial disease associated with mutation m.3243A > G

ABSTRACT

INTRODUCTION: The classic form of mitochondrial encephalomyopathy associated with m.3243A>G mutation is the Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes (MELAS syndrome). However, the spectrum of clinical manifestations of patients with this mutation is quite wide.

OBJECTIVE: To describe the clinical, laboratory and imaging spectrum of patients with mitochondrial disease due to m.3243A>G mutation

METHODS: A retrospective descriptive study of a series of cases of patients with the m.3243A>G mutation in follow-up in ANEM/HCFMRP-USP. Clinical data and information about additional tests were collected through systematic review of medical records of selected patients. Neuroimaging studies were reviewed with supervision of experienced neuroradiologist and the lesions were described.

RESULTS: Between May 2000 and May 2015, the mutation m.3243A>G was evaluated in a total of 817 patients, on DNA extracted from peripheral blood (n = 441), skeletal muscle biopsy samples (n = 293), both (n = 82) and more rarely urinary sediment cells (n = 1). We founded 16 individuals 12 families with the mutation, resulting in a mutation detection rate of 1.96 % that population. 12 individuals from nine families, who were following at our service, were included in this study. The most common findings in this series were in order of frequency: myopathy signs, neurobehavioral disorders, epilepsy, endocrine disorders, cerebellar ataxia, migraine, stroke-like episodes, recurrent vomiting, cardiac conduction disorders, peripheral neuropathy and signs of dysautonomia, myoclonus, sensorineural deafness, cortical blindness, uveitis, and proteinuria. In our series, we found that five of the patients were classified with the classical MELAS syndrome, two patients had CPEO associated with other symptoms such as psychiatric disorders and diabetes mellitus. The remaining patients had other features of mitochondrial disease not consistent with another recognised syndrome. In addition to stroke-like lesions, the more frequent lesions revealed in neuroimaging studies were deep gray matter changes, brain atrophy and white matter changes. These changes had similar prevalences between the patients with the classic syndrome of MELAS and patients who did not have stroke-like lesions. All patients with classical MELAS have lactate peak and 60% of them have reduction of NAA at spectroscopy; while these changes were found in two and one patient respectively, in the group of patients without stroke-like lesions. We identified azoospermia in one paciente with classic MELAS, a finding not previously associated with m.3243A>G. At moment, this is the largest Brazilian case series of patients with the m.3243A>G mutation.

CONCLUSION: The wide spectrum of clinical presentation and neuroimaging is a notable feature among patients with the mutation m.3243A> G mtDNA. This disorder should be considered in patients with evidence of signs and symptoms suggestive of multisystem involvement.

Keywords: m.3242A>G, MELAS, mitochondrial myopathies, mitochondrial DNA, neuroimaging, lactate, stroke-like.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADC	Coeficiente aparente de difusão
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular cerebral
C	Citosina
CAT	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Coq10	Coenzima Q10
COX	Citocromo <i>c</i> oxidase
CPEO	<i>Chronic Progressive External Ophthalmoplegia</i>
D-loop	Alça de deslocamento
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAmt	DNA mitocondrial
DNAn	DNA nuclear
Drp1	<i>Dynamin related protein 1</i>
DWI	Imagem pesada em difusão
ECG	Eletrocardiograma
ECO	Ecocardiografia
FADH₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina forma reduzida
Fis1	<i>Mitochondrial fission protein 1</i>
FLAIR	<i>Fluid Attenuation Inversion-Recovery</i>
G	Guanina
H	Cadeia pesada
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
L	Cadeia leve
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MELAS	<i>Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes</i>
MERRF	<i>Myoclonic Epilepsy with RRF</i>
MIDD	<i>Maternally inherited diabetes and deafness</i>
MNGIE	<i>Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy</i>
NAA	N-Acetil-Aspartato

NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NARP	<i>Neuropathy Ataxia and Retinitis Pigmentosa</i>
ON	Óxido Nítrico
OXPHOS	<i>Oxidative Phosphorylation</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
RE	Retículo endoplasmático
RNAr	Ácido ribonucleico ribossômico
RNAt	Ácido ribonucleico transportador
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RNMes	RNM com espectroscopia
RRF	<i>Ragged Red Fibers</i>
SDH	Succinato Desidrogenase
SNC	Sistema Nervoso Central
SPECT	<i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>
T	Timina
TC	Tomografia Computadorizada
VACTERL	<i>Vertebral, Anal, Cardiovascular, Tracheo-Esophageal, Renal, and Limb defects</i>
WPW	Wolff-Parkinson-White

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Critérios diagnósticos de MELAS

TABELA 2. Critérios diagnósticos de MELAS (*study committee in Japan*)

TABELA 3. Manifestações multissistêmicas na MELAS

TABELA 4. Características epidemiológicas e manifestações clínicas

TABELA 5. Sinais e Sintomas mais frequentes relacionados à mutação m.3243A>G.

TABELA 6. Características clínicas dos pacientes com MELAS e pacientes sem AVC

TABELA 7. Características laboratoriais

TABELA 8. Alterações encefálicas evidenciadas por Neuroimagem

TABELA 9. Percentual de alterações encefálicas (Lesões semelhantes a AVC X Sem AVC)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Cadeira respiratória mitocondrial.

FIGURA 2. Mapa do genoma mitocondrial humano

FIGURA 3. Heteroplasmia

FIGURA 4. Segregação replicativa.

FIGURA 5. Mutação patológica m.3243GA>G no gene MT-TL1 do DNAm^t

FIGURA 6. Biópsia Muscular do Paciente 6.

FIGURA 7. Neuroimagem de pacientes com MELAS.

FIGURA 8. Neuroimagem de pacientes sem lesões semelhantes a AVC.

FIGURA 9. Estudo de metabólitos encefálicos com RNMes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. A MITOCÔNDRIA.....	17
2.1.1. ESTRUTURA MITOCONDRIAL.....	17
2.1.2. FUNÇÕES	18
2.1.3. PRODUÇÃO ENERGÉTICA.....	21
2.2. GENOMA MITOCONDRIAL.....	22
2.3. GENÉTICA MITOCONDRIAL.....	24
2.4. DOENÇAS MITOCONDRIAS DEVIDO A MUTAÇÕES DO DNAm.....	27
2.5. DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS MITOCONDRIAS	30
2.6. MUTAÇÃO m.3243A>G	34
2.6.1. ALTERAÇÃO GENÉTICA.....	34
2.6.2. MELAS	36
2.6.3. ESPECTRO FENOTÍPICO DA MUTAÇÃO m.3243A>G.....	39
2.6.4. FISIOPATOLOGIA DOS EVENTOS SEMELHANTES A AVC	44
2.6.5. CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA	46
2.6.5.1. EXAMES LABORATORIAIS.....	46
2.6.5.2. NEUROIMAGEM.....	47
2.6.5.3. TESTE MOLECULAR	49
2.6.5.4. BIÓPSIA MUSCULAR E ENSAIOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA	49
3. JUSTIFICATIVA.....	50
4. OBJETIVOS.....	51
5. METODOLOGIA	51
5.1. DESENHO DO ESTUDO.....	51
5.2. POPULAÇÃO.....	51
5.3. COLETA DE DADOS	52
5.4. PESQUISA DA MUTAÇÃO m.3243A>G	53
5.5. VIESES.....	54
5.6. ANÁLISE DE DADOS.....	54
5.7. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	54
6. RESULTADOS.....	55
7. DISCUSSÃO.....	65
8. CONCLUSÃO	71
9. REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

A mitocôndria é a organela responsável pela produção da maior parte da energia necessária para a manutenção das funções celulares. As doenças mitocondriais estão relacionadas a disfunções envolvendo um de suas vias metabólicas, incluindo a via da beta oxidação mitocondrial dos ácidos graxos ou a cadeia respiratória. Essas disfunções podem ser causadas por alterações genéticas e são caracterizadas por desordens clinicamente heterogêneas, que frequentemente acometem diversos órgãos e sistemas e podem ter início em qualquer idade.

Dentre as doenças mitocondriais associadas a disfunção da cadeia respiratória, destacam-se as síndromes causada pela mutação m.3243A>G, a qual é considerada uma das mutações mitocondriais patogênicas mais comuns, com prevalência de 0,18 a 236/100.000 indivíduos¹⁻³. A mais conhecida síndrome relacionada a essa mutação é a MELAS (OMIM540000), caracterizada pela apresentação clínica de miopatia, encefalopatia, acidose láctica e eventos semelhantes a AVC⁴. Entretanto, grande heterogeneidade clínica é observada, não sendo a mutação m.3243A>G específica para a síndrome clássica da MELAS. Essa alteração genética tem sido frequentemente associada a um amplo espectro de manifestações clínicas em diferentes graus de intensidade de acometimento, o que torna o diagnóstico específico desafiador.

A identificação de 12 pacientes com a mutação m.3243A>G no decorrer de 15 anos, desde que iniciada a pesquisa molecular para esta mutação em nosso serviço, levou à necessidade de avaliação da diversidade de apresentação clínica e neuroimagem dos pacientes em seguimento no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (ANEM/HCFMRP-USP).

Por isso, este estudo se propõe a caracterizar as manifestações clínicas e de neuroimagem de pacientes com doença mitocondrial associada à mutação m.3243A>G. Os dados gerados deverão levar ao aperfeiçoamento das estratégias diagnósticas utilizadas no ANEM/HCFMRP-USP, assim como contribuir para a ampliação dos conhecimentos sobre o espectro clínico de uma das mais mutações frequentes do DNA mitocondrial (DNAm).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A MITOCÔNDRIA

A mitocôndria é uma organela delimitada por uma dupla membrana e encontra-se presente em quase todas células eucariotas. É responsável pelo fornecimento da maior parte da energia requerida pela célula, através do processo chamado fosforilação oxidativa (OXPHOS - do inglês *oxidative phosphorylation*) que produz trifosfato de adenosina (ATP). Além disso, também participa de processos centrais para a manutenção da vida celular como a sinalização do cálcio, sínteses de proteínas, controle do ciclo celular, diferenciação e morte celular⁵.

Existem duas hipóteses sobre a origem da mitocôndria: endossimbiose e autogênese. A hipótese da endossimbiose defende que as mitocôndrias eram originalmente células procarióticas que, num dado momento da evolução, há cerca de dois bilhões de anos, tornaram-se endossimbióticas e implementaram mecanismos oxidativos inexistentes nas células eucarióticas. A outra hipótese, da autogênese, defende que a mitocôndria foi gerada através de uma partícula do DNA nuclear (DNAn) da célula eucariótica. Como a mitocôndria partilha de diversas características com as bactérias, a primeira hipótese é a mais aceita atualmente^{6,7}.

2.1.1. ESTRUTURA MITOCONDRIAL

A organela é constituída de uma membrana externa, espaço intermembranoso, uma membrana interna, altamente invaginada que forma as cristas, e a matriz mitocondrial, que é delimitada pela membrana interna⁸.

A membrana externa, que envolve toda a organela, é constituída por uma mistura de fosfolipídios e proteínas similar à da membrana plasmática das células eucarióticas (1:1 proteína:fosfolipídeos). Contém porinas e é relativamente permeável às moléculas do citosol. Ela pode estar associada ao retículo endoplasmático (RE), envolvido na sinalização do cálcio e transferência de lipídeos entre as duas organelas.

O espaço intermembranoso possui uma concentração de pequenas moléculas, como íons e açúcares, semelhantes aos do citosol, devido à relativa permeabilidade da membrana externa.

Já a membrana interna tem uma proporção maior de proteínas embebidas (3:1 proteína:fosfolípidos). Isso porque essa membrana possui proteínas com cinco tipos de função diferentes: as proteínas da cadeia respiratória, a ATP sintase, proteínas de transporte para dentro e para fora da matriz, proteínas de fusão e de fissão. Não possui porinas e, por isso, é impermeável a todas as grandes moléculas. Além disso, possui um fosfolípido pouco comum, a cardiolipina.

As cristas são formadas por invaginações da membrana interna, aumentando assim a área capaz de produzir ATP.

A matriz mitocondrial é o espaço limitado pela membrana interna. É repleto de enzimas necessárias para a produção energética através da oxidação do piruvato, betaoxidação dos ácidos graxos e ciclo dos ácidos tricarboxílicos (CAT).

2.1.2. FUNÇÕES

A homeostase energética mitocondrial está fortemente ligada a morfologia dessa organela que é determinada pelo equilíbrio entre os mecanismos de fusão e fissão^{5,9}. Esse equilíbrio determina, então, a estabilidade da morfologia da organela, a funcionalidade bioenergética, o controle metabólico, a distribuição do DNAm^t e o número de organelas. Durante a fusão mitocondrial, duas mitocôndrias fundem suas membranas internas e externas e se transformam em uma única mitocôndria. A fissão mitocondrial é o processo oposto, quando uma mitocôndria se divide em duas.

A fusão mitocondrial é necessária para manter a homogeneidade da população da organela já que permite o compartilhamento genômico e de outros componentes entre as mitocôndrias¹⁰. Uma das principais funções da fusão mitocondrial é estabelecer uma rede de comunicação entre as organelas e facilitar o acesso a produtos da expressão do DNAm^t⁷. Essa função é orquestrada por um processo que ocorre em dois passos, quando as membranas interna e externa se fundem por mecanismos separados: as proteínas Mitofusina 1 e Mitofusina 2 comandam a fusão da membrana externa; a proteína *Optic Atrophy 1* controla a fusão da membrana interna, além de manter a morfologia das cristas. A Mitofusina 2 também está envolvida na aproximação da

mitocôndria ao RE, de modo que sua perda aumenta a distância entre as organelas e impede o efluxo de cálcio do RE para a mitocôndria⁵.

A fissão mitocondrial é essencial para a variabilidade genética e para a multiplicação da organela, já que sua quantidade é bem variável nos vários tecidos e órgãos. Essa variabilidade genética é responsável pela diversificada habilidade de produção de ATP conforme demanda tecidual e também aumenta a capacidade de gerar espécies reativas do oxigênio, o que aumenta a suscetibilidade da célula a apoptose. A fissão também é necessária para que mitocôndrias senescentes e/ou danificadas tornem-se pequenas o bastante para que sejam encapsuladas por vesículas líticas através de mitofagia, uma forma especializada de autofagia, para que sejam degradadas e recicladas^{5,9}. O processo da mitofagia permite a manutenção da qualidade da população mitocondrial. Quando insuficiente, pode resultar em acúmulo de mitocôndrias disfuncionais que provocam um desequilíbrio energético e metabólico que, em situações críticas, culminam em morte celular¹¹.

A fissão ocorre através da função de duas proteínas: a *Dynamin related protein 1* (Drp1) e a *Mitochondrial fission protein 1* (Fis1). A Drp1 penetra na membrana externa, no local de contato com o RE, formando estruturas multiméricas semelhantes a anéis que facilitam a cisão da membrana; enquanto que o mecanismo proposto para a Fis1 é que ela seja um receptor para a Drp1⁵.

Morte celular é geralmente classificada como apoptose ou necrose, apesar de existir um espectro entre as duas classificações mais reconhecidas⁵. Enquanto a necrose é um processo acidental tipicamente decorrente de falência metabólica, a apoptose é um processo de morte celular programada, ativa e coordenada que é dependente de energia para ocorrer. É essencial para a remoção de células danificadas, tanto no desenvolvimento precoce como no envelhecimento. A apoptose celular é regulada pela mitocôndria através da liberação de citocromo *c*, uma enzima da cadeia transportadora de elétrons, no citosol. Esse ponto é crucial para a sobrevivência celular, e, assim que a apoptose é iniciada, o processo torna-se irreversível.

O equilíbrio entre a demanda energética tecidual e a produção energética mitocondrial através da OXPHOS é fundamentalmente coordenada através da comunicação entre a mitocôndria e o citosol⁵. Essa comunicação ocorre primariamente através da sinalização do cálcio, que orchestra a maioria das atividades celulares que necessitam de aumento da concentração desse íon no citosol, como a secreção, contração, motilidade e excitabilidade elétrica.

Há cerca de 50 anos, diversos grupos demonstraram simultaneamente a íntima relação entre o cálcio e a mitocôndria ao descobrirem que mitocôndrias purificadas e energizadas internalizavam grande quantidade de cálcio quando provido com fosfato¹².

O processo de captação mitocondrial de cálcio ocorre através do complexo uniporta mitocondrial de cálcio, um canal seletivo de cálcio que fica situado na membrana interna da mitocôndria e transporta cálcio de forma eletrogênica, dissipando o potencial de membrana gerado pela cadeia respiratória, sem a necessidade de ser cotransportado com um ânion ou ser trocado por outro cátion¹². O aumento desse íon na mitocôndria ativa três enzimas essenciais para a taxa de produtividade do CAT: piruvato, alfa-oxoglutarato e NAD-isocitrato desidrogenase. O aumento da concentração do cálcio na matriz mitocondrial aumenta também a função da ATP sintase e ativa o transpostador glutamato/aspartato na membrana interna da mitocôndria. Desse modo, esses processos agem sinergicamente para adequar produção energética mitocondrial à demanda tecidual. Além disso, a entrada de cálcio na mitocôndria regula a concentração desse íon no citosol e a maioria das formas de morte celular é associada a aumento excessivo de cálcio na mitocôndria^{5,12}. Alguns estudos demonstraram também que a insuficiência do complexo uniporta mitocondrial de cálcio também está ligada à redução da secreção de insulina estimulada por glicose^{13,14}.

As mitocôndrias também têm a capacidade de regular, no nível intracelular, diversas funções celulares, incluindo crescimento, diferenciação, migração, autofagia e morte celular. Isso é possível devido à proximidade das mitocôndrias ao núcleo celular no local onde ele promove o remodelamento da cromatina. Em um estudo realizado com células híbridas (células derivadas de uma linhagem de osteossarcoma com contingente de DNAm de célula linfoblastoide normal e mutante manipulado *in vitro*) verificou-se um efeito dose-dependente da disfunção mitocondrial no modelamento e na expressão genética nuclear ao ser visto que altos níveis de uma das mutações mais comuns do DNAm (m.3243A>G) causam um complexo padrão de transcrição que impacta mais de 17000 genes nucleares¹⁵. Postula-se que existem junções intermitocondriais eletroquímicas, como são as sinapses neuronais, através das quais as mitocôndrias de uma célula se comunicam e transmitem umas às outras informações sobre o ambiente celular¹⁶. Essas sinapses mitocondriais eletroquímicas, não dependentes da função das proteínas responsáveis pelo processo de fusão, são temporárias e estão situadas entre as cristas de mitocôndrias vizinhas, nos pontos de junção da membrana interna com a externa. No contexto de processamento de sinais, a formação de um conjunto de mitocôndrias ligadas por sinapses

mitocondriais tem o papel de gerar sinais coordenados temporalmente e mais potentes para interferir na expressão do DNA¹⁶.

2.1.3. PRODUÇÃO ENERGÉTICA

Uma das principais funções da mitocôndria é a produção de energia para a célula sob a forma de ATP através da oxidação de açúcares, gordura e proteínas⁵.

Os açúcares entram na mitocôndria como piruvato, após passarem pela glicólise no citosol. Na matriz mitocondrial, o piruvato é convertido em acetil-CoA. A betaoxidação converte ácidos graxos em acetil-CoA na matriz mitocondrial. Já os aminoácidos são catabolizados por enzimas que os convertem em piruvato, acetil-CoA ou em intermediários específicos do CAT.

No CAT as moléculas de acetil-CoA são reduzidas para a produção de elétrons, que são carregados pelas formas reduzidas do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH₂).

A cadeia respiratória (Figura 1) é composta por quatro complexos polipeptídicos (complexos I, II, III e IV) e dois pequenos carregadores móveis de elétrons (coenzima Q10 - CoQ10 - e o citocromo *c*) que, associados à enzima ATP sintase (complexo V), formam o sistema da OXPHOS que se encontra imerso nas cristas da membrana interna mitocondrial. Esse sistema é composto por aproximadamente 85 subunidades polipeptídicas, das quais apenas 13 são codificadas pelo DNAm.

FIGURA 1. Cadeira respiratória na membrana mitocondrial interna. H⁺: prótons. e⁻: elétrons. cit *c*: citocromo *c*. C: complexo. O₂: molécula de oxigênio. H₂O: molécula de água

Os elétrons transportados pelo NADH e FADH₂ fornecem elétrons para os complexos I e II, respectivamente. Os elétrons são carregados pela Coq10 dos complexos I e II para o complexo III, e desse para o complexo IV pelo citocromo *c*. Ao chegar no complexo IV, os elétrons são atraídos por uma molécula de oxigênio para a formação de água. Concomitante a essa passagem

horizontal de energia, os complexos I, III e IV bombeiam prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso. Esse processo gera um gradiente eletroquímico de prótons entre as faces da membrana interna, que é então utilizado para “girar” o complexo V, um processo motor rotatório que converte ADP e fosforo inorgânico em ATP⁷.

O complexo I (NADH desidrogenase-ubiquinona oxidoredutase) transfere os elétrons do NADH para a CoQ10. Ele é composto por cerca de 40 subunidades, sendo apenas sete delas codificadas pelo DNAm. A deficiência nesse complexo é uma das causas mais comuns de encefalomiopatia mitocondrial.

O complexo II (Succinato desidrogenase-ubiquinona oxidoredutase) oxida succinato em fumarato e transfere os elétrons do FADH₂ para a CoQ10. É o único complexo completamente codificado pelo DNA nuclear, sendo composto por quatro subunidades.

O complexo III (ubiquinona- citocromo *c* redutase) transfere os elétrons da CoQ10 para o citocromo *c*. É formado por 11 subunidades, sendo 1 codificada pelo DNAm.

O Complexo IV (citocromo *c* oxidase) transfere os elétrons do citocromo *c* para oceptor final, oxigênio, para a formação de água. Ele é constituído por treze subunidades, sendo que as três maiores codificadas pelo DNAm.

O complexo V é formado por 14 subunidades, sendo 2 delas codificadas pelo DNAm.

2.2. GENOMA MITOCONDRIAL

A mitocôndria é a única organela celular que contém seu próprio DNA, que fica localizado em sua matriz. Em mamíferos, cada célula contém centenas de mitocôndrias, a depender de sua demanda metabólica, sendo que cada organela possui de 2 a 10 cópias de DNAm. Para que haja funcionamento adequado da OXPHOS em cada tecido, é necessário o número apropriado de cópias de DNAm íntegras¹⁷.

O genoma mitocondrial humano é uma molécula de DNA de dupla fita circular fechada, relativamente pequena e compacta, com sequência nucleotídica contendo 16569 pares de bases (MITOMAP, www.mitomap.org)⁴. É formado por duas cadeias, uma leve (L) e outra pesada (H), que podem ser distinguidas através da quantidade de guaninas e timinas em cada uma delas, o que resulta numa diferença de densidade que torna a cadeia rica em Guaninas mais pesada. A região D-loop, estrutura composta por uma tripla fita de DNAm (pequena fita de ácidos nucleicos complementar à cadeia L, que desloca a cadeia H) que é limitada pelos genes do RNAt

(citocromo *b*), 3 subunidades do complexo IV (COXI, COXII e COXIII) e 2 subunidades da ATP sintase (ATP sintase 6 e 8)²⁰. As demais subunidades do aparato energético mitocondrial, em um total de aproximadamente 85, são produzidas pelo DNAn^{4,18,21}.

Outra característica do genoma mitocondrial é o uso de um mecanismo simplificado para transcrição de proteínas, de modo que apenas 22 RNAt codificados pelo DNAm são suficientes para a tradução dos 13 genes de produtos proteicos mitocondriais¹⁸. Isso é possível devido à teoria da oscilação de Crick (*Wobble hypothesis*) que postula que a terceira base nitrogenada do códon oscila de modo que mais de uma base pode ser pareada na mesma posição do anticódon²².

2.3. GENÉTICA MITOCONDRIAL

Mutações no DNAm são uma causa comum de doenças hereditárias que se apresentam com grande heterogeneidade clínica. Para o entendimento da patogênese dessas disfunções, é necessária a compreensão das normas que regem a genética mitocondrial, em destaque: herança materna, heteroplasmia, efeito limiar e segregação replicativa.

Em humanos, o padrão de herança estritamente matrilinear do DNAm foi demonstrado na década de 80²³. Até o momento, apenas um caso de transmissão paterna foi relatado²⁴. A seleção materna do DNAm é explicada atualmente por três possíveis teorias: 1. Efeito de diluição; 2. Ubiquitinação seletiva do DNAm paterno; 3. O colo do espermatozoide - região que armazena as mitocôndrias - não é introduzido no zigoto⁹. Esses fenômenos são importantes porque promovem maior homogeneidade das cópias do DNAm, já que elas terão origem uniparental. Dessa forma, as mutações mitocondriais maternas poderão ser transmitidas a toda sua prole, porém apenas as filhas serão capazes de transmiti-las à próxima geração.

Os espermatozoides possuem número muito baixo de cópias de DNAm (cerca de 50 a 75 cópias), enquanto que em ovócitos esse número é extremamente alto (maior que 100.000 cópias)¹⁸. A partir dessa proporção, já se poderia explicar a herança materna do DNAm como simples resultado de diluição da contribuição paterna além do poder de detecção dos métodos de análise dos estudos mais antigos. Estudos mais recentes mostraram que as mitocôndrias espermáticas são transferidas aos ovócitos durante a fertilização^{10,24}. Entretanto, existe um processo de eliminação dessas mitocôndrias paternas já nos primeiros estágios da embriogênese. Estudos realizados com embriões advindos de técnicas de reprodução assistida mostraram que o

DNAmt paterno podia ser detectado em alguns embriões nos estágios de 4 a 8 células²⁵. Já pesquisas realizadas em neonatos concebidos por injeção intracitoplasmática de espermatozoide, não demonstraram a presença de genoma mitocondrial paterno²⁶. Postula-se que o espermatozoide liga-se à ubiquitina durante o trajeto pelo sistema reprodutor masculino e, na formação do zigoto, o DNAmt espermático é removido por ubiquitinação, processo através do qual substratos ubiquitinados são direcionados para os locais de degradação por lisossomos ou proteossomos^{10,27}.

Cada célula contém centenas ou milhares de cópias de DNAmt que, durante a divisão celular, distribuem-se randomicamente entre suas células filhas. Em circunstâncias normais, todas as cópias de DNAmt de uma célula são idênticas; um fenômeno conhecido como homoplasma. Já as mutações patogênicas do DNAmt têm natureza poliploide, o que significa que frequentemente elas coexistem com cópias normais em uma mesma célula, termo chamado de heteroplasma (Figura 3)²⁸. A porcentagem de DNAmt mutante pode variar muito entre as diversas células de um tecido ou órgão, chegando a representar de 0% a 100% do genoma mitocondrial celular. Recentemente foi revelado um baixo percentual de heteroplasma (0,2% a 2%) no sangue e no músculo esquelético de indivíduos hígidos, um fenômeno chamado heteroplasma universal²⁰. Dessa forma, mutações silentes no DNAmt podem se expandir nas gerações futuras e se manifestar como doenças mitocondriais *de novo*.

FIGURA 3. Heteroplasma. A: Homoplasma (todas as cópias de DNAmt são iguais). B: Heteroplasma (Coexistência de cópias distintas de DNAmt, em geral normais e com mutação, em proporções variadas). DNAmt normal: verde. DNAmt mutante: vermelho. Adaptado de Davis *et al.*, 2011²⁸.

Diferentemente do DNA, a replicação do DNAmt não é comandada pelo ciclo celular, de modo que tanto a mitocôndria como as cópias de DNAmt (mutantes e/ou normais) podem se replicar a qualquer momento a depender da demanda energética tecidual. Em um cenário de heteroplasma, as cópias de DNAmt podem ser redistribuídas aleatoriamente (segregação

replicativa) e, conseqüentemente, a proporção de DNA mutante na mitocôndria filha pode não ser idêntica à da mitocôndria mãe. Isso explica em parte porque membros de uma mesma família acometidos pela mesma doença mitocondrial têm expressão fenotípica com intensidade tão variada (Figura 4).

FIGURA 4. Segregação replicativa. As células filhas podem ter diferentes porcentagens de DNAm_t com mutações. O grau de disfunção mitocondrial será mais grave naquelas células que contiverem maior quantidade de DNAm_t mutante. DNAm_t normal: verde. DNAm_t mutante: vermelho. Adaptado de Davis *et al.*, 2011²⁸.

A associação da heteroplasmia e da segregação replicativa leva à maior suscetibilidade de alguns tecidos para o acúmulo de DNAm_t mutantes. Os tecidos pós-mitóticos, como neurônios e músculo esquelético e cardíaco, possuem baixa capacidade de replicação de suas células e, por isso, necessitam reciclar constantemente suas mitocôndrias o que aumenta a chance de acúmulo de células com maior proporção de DNAm_t mutante. Os tecidos com alta demanda energética e que se replicam rapidamente, como o tecido hematopoiético e hepático, tem maior chance de selecionar células saudáveis, eliminando aquelas com maior quantidade de DNAm_t mutante. Se a mutação levar a disfunção mitocondrial, interferindo no processo de produção de ATP pela OXPHOS, as células que contiverem maior proporção de DNAm_t normal terão vantagem de sobrevivência. Sendo assim, os tecidos com maior taxa de replicação eliminam, a cada ciclo, as células com acúmulo de DNAm_t mutante e selecionam as células normais^{28,29}.

Em geral, quanto maior o número de DNAm^t mutante, maior será o grau de disfunção mitocondrial dentro de uma célula; sendo que é necessário um número mínimo percentual de cópias mutantes num tecido ou órgão para que haja a expressão clínica de uma doença mitocondrial²⁸. Esse número crítico necessário para a expressão fenotípica de uma doença mitocondrial é chamado de Efeito Limiar de Manifestação, que atua em diversos níveis de expressão da mutação do DNAm^t (transcrição, translação, atividade enzimática e produção energética) e constitui um eficiente mecanismo de segurança que confere estabilidade para a célula³⁰. O limiar varia a depender do quanto que a alteração do genoma mitocondrial pode causar disfunção, sendo de aproximadamente 60% para as deleções do DNAm^t e de 90% para as mutações de ponto³⁰. Alguns estudos demonstraram que o limiar de manifestação da MERRF e da MELAS eram de 90% e 65%, respectivamente³⁰. Além disso, o limiar também pode variar a depender da demanda metabólica tecidual, sendo os músculos esquelético e cardíaco, cérebro e pâncreas os mais vulneráveis³⁰.

Em um estudo com celular híbridas, Picard *et al.* demonstraram que a disfunção mitocondrial sobre o modelamento das cromatinas e na expressão genética nuclear há um efeito é dependente da quantidades de DNAm^t mutante, de modo que a expressão clínica de doenças causadas por mutações do DNAm^t estão diretamente ligadas a faixas de heteroplasmia¹⁵.

2.4. DOENÇAS MITOCONDRIAIS DEVIDO A MUTAÇÕES DO DNAm^t

Doenças mitocondriais são um grupo de desordens clinicamente heterogêneas decorrentes de disfunção de uma das vias metabólicas da mitocôndria. Frequentemente acometem diversos órgãos e sistemas e podem ter início em qualquer faixa etária. As disfunções mitocondriais por prejuízo da produção energética, através do comprometimento da OXPHOS, podem advir de mutações no DNAm^t (que causam doenças esporádicas ou com herança materna) ou de mutações no DNAn (que apresentam herança mendeliana). Mutações patogênicas causadoras de disfunção mitocondrial já foram identificadas em mais de 30 dos 37 genes mitocondriais e em mais de 30 genes nucleares³¹.

O primeiro caso de uma doença mitocondrial foi relatado em 1962 por Luft, que descreveu um caso de uma jovem que apresentava quadro de hipermetabolismo na ausência de doença tireoidiana, mitocôndria muscular com morfologia alterada e evidencia bioquímica de disfunção

mitocondrial (síndrome de Luft)³². Em 1963, Engel e Cunningham desenvolveram a coloração histológica tricrômico de Gomori modificada, uma técnica que permite a observação de proliferação de organelas, com padrões de coloração típicos para proliferação mitocondrial³³. Áreas irregulares de acúmulo de mitocôndrias intermiofibrilares e subsarcolemas aparecem com a cor vermelha. Essas fibras anormais foram então denominadas “fibras vermelhas rasgadas” (RRF - do inglês “ragged red fibers”) e, por terem tornado o diagnóstico mais fácil do que por técnicas de microscopia eletrônica, tornou-se a marca patológica das doenças mitocondriais²⁸. A coloração tricrômico de Gomori modificada é hoje utilizada em conjunto com outras colorações histoquímicas como a SDH e a COX para identificação de fibras com disfunção mitocondrial.

Na década de 70, percebeu-se que os pacientes com RRF frequentemente apresentavam outros sinais e sintomas que indicavam envolvimento cerebral associado ao muscular³⁴. Devido à alta demanda energética do cérebro humano, as apresentações de doenças mitocondriais frequentemente envolvem sintomas neurológicos. Nesse momento, o termo “encefalomiopatias mitocondriais” foi introduzido para designar o conjunto de síndromes que apresentavam combinações diversificadas de sinais e sintomas decorrentes de maior envolvimento musculoesquelético e cerebral³⁵. Outras manifestações clínicas envolvendo a sobreposição de acometimento de vários sistemas são também descritas e revelam a enorme variabilidade fenotípica dessas síndromes.

As manifestações clínicas podem afetar qualquer sistema no corpo, incluindo o auditivo (surdez neurosensorial), visual (retinite pigmentosa, ptose palpebral, oftalmoplegia externa progressiva, atrofia óptica), muscular (fraqueza muscular, intolerância ao exercício, disfagia, disartria, fadiga, câimbras), neurológico (demência, convulsão, migrânea, distúrbios de movimento, polineuropatia, déficits focais como hemiplegia e hemianopsia), cardíaco (arritmia cardíaca, cardiomiopatia hipertrófica, bloqueios de condução), gastrointestinal (pseudo-obstrução, constipação), endócrino (diabetes, baixa estatura, hipoparatiroidismo), renal (acidose tubular renal/síndrome de Fanconi, glomerulonefrite), hepático (hepatopatia), sistema reprodutor (infertilidade)²⁸.

Inicialmente, as alterações mitocondriais da cadeia respiratória eram caracterizadas dos pontos de vista morfológico e bioquímico, com a caracterização de deficiências isoladas ou combinadas dos complexos I, II, III e IV³⁴.

A partir do início da era molecular, autores identificaram defeitos genéticos mais frequentemente associados às reconhecidas síndromes clínicas, cuja denominação em geral deriva da combinação de suas características clínicas: síndrome de Kearns-Sayre; oftalmoplegia

externa progressiva crônica (*Chronic Progressive External Ophthalmoplegia* - CPEO); síndrome de Leigh; epilepsia mioclônica com RRF (*Myoclonic Epilepsy with RRF* - MERRF); miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (MELAS); neuropatia óptica hereditária de Leber; neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa (NARP), encefalomiopatia mitocondrial neuro-gastro-intestinal (*Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy* - MNGIE) e surdez e diabetes com herança materna (*Maternally Inherited Diabetes and Deafness* - MIDD). A validade dessas síndromes tem sido largamente confirmada e a maioria já foi associada a uma ou algumas poucas mutações do DNAm²⁹.

As primeiras mutações patogênicas do DNAm foram publicadas em 1988, sete anos após sequenciamento do genoma mitocondrial^{36,37}. Desde então, já foram descritas cerca de 260 mutações de ponto e 120 rearranjos (duplicações, deleções únicas ou deleções múltiplas) do DNAm que causam doenças mitocondriais²⁰. O grande número de mutações do DNAm é atribuído, em parte, à proximidade espacial entre o DNAm e a cadeia respiratória e seus subprodutos, os radicais livres, que são genotóxicos e causam efeitos mutagênicos e citotóxicos³⁸.

As mutações do DNAm podem também ser divididas entre aquelas que afetam a síntese proteica mitocondrial (mutações e rearranjos nos genes responsáveis por RNAt ou RNAr) e aquelas que afetam uma das 13 subunidades da cadeia respiratória codificadas pelo DNAm²⁹.

Mutações no DNAm são uma importante causa de doenças genéticas, porém, devido à heterogeneidade fenotípica e genotípica das disfunções mitocondriais, torna-se difícil avaliar o impacto epidemiológico das doenças mitocondriais. Estima-se que 1 em cada 5000 indivíduos possui doença mitocondrial manifesta e que 1 a cada 200 neonatos é portador de alguma mutação patogênica do DNAm na Inglaterra^{38,39}. Shaefer *et al.* evidenciaram no nordeste da Inglaterra uma prevalência de doenças mitocondriais de 9,18/100000 indivíduos e uma prevalência de parentes de primeiro grau assintomáticos com mutação do DNAm de 16,5/100000 indivíduos⁴⁰. Estudos populacionais realizados na faixa etária pediátrica identificaram prevalências de doenças mitocondriais de 4,7/100000 no oeste da Suécia e de 5,0 a 13,1/100000 nascidos no Sudeste da Austrália^{41,42}.

2.5. DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS

Disfunção mitocondrial deve ser considerada no diagnóstico diferencial de qualquer desordem multissistêmica progressiva. Entretanto, a suspeita de uma doença mitocondrial torna-se um desafio diagnóstico complexo devido à heterogeneidade clínica e genética desse grupo de doenças.

Herança materna pode ser um indicativo de que a doença está relacionada a mutação no DNAm, porém ela pode não se encontrar muito evidente devido à variação da heteroplasmia – e, conseqüentemente, da gravidade dos sintomas – entre indivíduos de uma mesma família. Uma história de herança matrilinear parece ser mais comumente encontrada em pacientes com uma mutação de ponto de RNAt e naqueles com mutações em genes de subunidades da cadeia respiratória do que com deleções⁴³. A história familiar deve ser meticulosamente revista, de modo que até sinais sutis sejam detectados na linhagem materna, como migrânea, intolerância ao exercício e distúrbios psiquiátricos. Já um padrão de herança mendeliana, principalmente com heredogramas mostrando um padrão de herança autossômico recessivo, e história de consanguinidade devem indicar uma possível mutação do DNAn.

A confirmação de uma doença mitocondrial requer uma análise clínica e laboratorial ampla que envolve: 1. testes bioquímicos que demonstram disfunção da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa, 2. estudos de imagem com avaliação de metabólitos, 3. biópsia muscular que evidencia disfunção mitocondrial através das RRF e atividades enzimáticas específicas, em casos necessários e 4. estudo molecular para confirmar o diagnóstico definitivo. Outros exames também dão suporte ao diagnóstico, como a eletroneuromiografia e outros que permitem a identificação e caracterização de acometimento multissistêmico, como o eletrocardiograma e a ecocardiografia^{44,45}.

A elevação desproporcional do nível de lactato em relação ao piruvato, com aumento da relação lactato/piruvato, no sangue ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) é um importante indicador de disfunção mitocondrial. Esse aumento reflete a inabilidade da mitocôndria disfuncional de gerar ATP suficiente, levando a um desequilíbrio do processo redox com conseqüente aumento do lactato⁴⁶. A obtenção acurada do nível do piruvato pode ser difícil, mas necessária para a quantificação da razão de lactato/piruvato, que reflete indiretamente o estado de redução do NADH/NAD⁺ (o piruvato em excesso é convertido em lactato pela lactato

desidrogenase, que catalisa a redução do piruvato a lactato utilizando o NADH na fase oxidativa)^{44,46}.

Pacientes com doenças mitocondriais podem ter níveis de lactato e piruvato normais, mesmo que estejam em plena crise metabólica ou após exercício. Em contrapartida, elevações plasmáticas de lactato podem ser detectadas devido à baixa qualidade técnica da coleta de amostra sanguínea ou devido a outras condições sistêmicas como infecções, neoplasia e doenças inflamatórias⁴⁴.

Quantificação de aminoácidos no sangue e no LCR não é realizada frequentemente para o diagnóstico de disfunções mitocondriais, entretanto, a elevação plasmática da alanina (aminoácido formado por transaminação entre piruvato e glutamato) é um bom indicador de acúmulo crônico de piruvato. Outros aminoácidos que podem estar elevados em doenças mitocondriais são a glicina, a prolina e a sarcosina. A análise de aminoácidos na urina é útil quando é detectado baixo nível sérico de bicarbonato. A detecção de aminoacidúria, acidose tubular renal e glicosúria leva ao diagnóstico de síndrome de Fanconi que pode ser vista em doenças mitocondriais⁴⁴.

Os estudos de imagem cerebral realizados com Tomografia Computadorizada (TC) e Ressonância Nuclear Magnética (RNM) são importantes para avaliação de alterações anatômicas associadas a disfunções mitocondriais⁴⁷. Entretanto, os achados de TC e RNM, quando presentes, são inespecíficos ou mudam muito com o tempo. As novas técnicas de neuroimagem que utilizam RNM com espectroscopia de prótons (RNMes) são capazes de detectar componentes metabólicos como o lactato, N-acetil-aspartato (NAA), succinato creatina, colina e mio-inositol. O lactato eleva-se no tecido cerebral quando há disfunção mitocondrial, causando um aumento da glicólise anaeróbica. Apesar de ser um forte indício de doença mitocondrial, o achado de pico de lactato na RNMes tem baixa sensibilidade (18 a 27%), de modo que sua ausência não exclui o diagnóstico⁴⁴. O NAA é um bom marcador de integridade neuronal, além de ser um marcador funcional das mitocôndrias neuronais - já que é um metabólito sintetizado dentro dessas organelas. Dessa forma, redução do NAA pode estar relacionada à disfunção mitocondrial. Succinato é um componente do CAT que se apresenta em baixos níveis no tecido cerebral, de modo que seu sinal não é visível em RNMes em situações normais. Aumento do sinal do succinato pode estar relacionado à deficiência da atividade da cadeia respiratória, em especial à deficiência do complexo II.

Diferentemente das doenças genéticas nucleares, que apresentam uma uniformidade quanto às anormalidades moleculares distribuídas em diversos tecidos, a maioria das mutações

patogênicas do DNAm são heteroplásmicas e a quantidade de cópias mutantes de cada célula e/ou tecido pode variar de forma estocástica em um mesmo indivíduo. A partir da compreensão dessa variabilidade genética tecidual, torna-se imprescindível, durante o processo de investigação de doenças mitocondriais, a correta escolha de material para análise patológica e molecular. O melhor tecido a ser selecionado para análise deve ser aquele mais afetado pelo processo patológico no paciente.

Nos tecidos que apresentam alta demanda bioenergética e estão em constante divisão mitótica, como as células sanguíneas e hepáticas, as mitocôndrias com alta heteroplasmia tendem a ser eliminadas durante o processo de segregação mitogênica, já que as mitocôndrias com maior quantidade de DNAm normal têm vantagem de sobrevivência para a manutenção do equilíbrio energético. Células hemáticas, como leucócitos e plaquetas, não são ideais para a pesquisa de mutações do DNAm, já que as cópias mutantes tendem a desaparecer de forma idade dependente⁴⁸. Tecidos que mantêm alta divisão celular, entretanto com menor demanda energética, como o folículo capilar, apresentam menor poder de seleção de mitocôndrias com baixa heteroplasmia e, dessa forma, o DNAm mutante persiste. Já células do sedimento urinário foram células que morreram devido à alta heteroplasmia e foram eliminadas na urina mantendo sua alta carga mutante, podendo então serem coletadas e analisadas posteriormente^{49,50}. O músculo esquelético é um tecido que não apresenta mais a possibilidade de selecionar mitocôndrias com menor heteroplasmia, já que é um tecido que não sofre mais divisão celular intensa.

A biópsia muscular permite análise anatômica, molecular e bioquímica. A análise morfológica de espécime muscular permite o achado de fibras musculares com alta proliferação mitocondrial, o que é muito sugestivo de disfunção energética dessa organela.

As colorações histológicas são as que revelam de forma mais clara as desordens mitocondriais. A técnica de coloração com hematoxilina e eosina pode revelar alterações miopáticas inespecíficas como fina vacuolização e algumas fibras atroficas⁵¹. Classicamente, áreas irregulares de acúmulo de mitocôndrias intermiofibrilares e subsarcolemas são identificadas pela técnica de coloração tricrômico de Gomori modificada, que aparecem com coloração avermelhada, e chamadas de RRF.

Adicionalmente, outras técnicas de reações histoquímicas permitem também a análise da atividade enzimática oxidativa dos complexos da cadeia respiratória, como a succinato desidrogenase (SDH) e a citocromo *c* oxidase (COX)⁴⁴.

Da mesma forma que a coloração tricrômico de Gomori modificada, a SDH permite a identificação de RRF. Como a SDH é um componente enzimático do complexo II da cadeia

respiratória, que é totalmente codificado pelo DNAn, sua atividade é frequentemente mantida e o acúmulo de mitocôndrias é facilmente identificado^{20,44}. A atividade da COX, constituinte do complexo IV, é extremamente variável nas doenças mitocondriais, de modo que podem ser vistas fibras com aumento de sua atividade, ou elas podem apresentar ausência da atividade da COX^{20,44}. Sendo assim, os pacientes com mutações do DNAm podem apresentar um mosaico de defeito da atividade da COX que pode ter correlação com as RRF. O método que combina as colorações da COX e SDH é útil já que pode revelar as fibras com ausência de atividade COX que mantem a atividade da SDH, as chamadas “fibras azuis rasgadas” (assim denominadas por analogia com as RRF)²⁰.

A análise bioquímica da cadeia respiratória é tecnicamente difícil e podem existir diferenças entre as metodologias adotadas em cada laboratório. A investigação bioquímica deve preferencialmente ser realizada em mitocôndrias musculares intactas⁵². Através dessa análise, realizada por espectrofotometria, é possível estudar de forma individualizada as atividades do complexo I, complexo II, complexo III, complexo IV ou de forma combinada os complexos I+II e complexos II+III. A análise combinada dos complexo I+II e II+III fornece informação útil para o diagnóstico de deficiência da CoQ10 ou desordens que afetam a produção da CoQ10, que podem ser confirmadas através da quantificação da CoQ10 no músculo^{44,51,52}. Os resultados desses ensaios enzimáticos podem ser bastante variáveis e mesmo um paciente que apresente claramente uma doença relacionada a desordem da OXPHOS pode apresentar uma análise bioquímica da cadeia respiratória normal. Deficiências parciais de múltiplos complexos são comuns em pacientes com mutação no DNAm, como deleções ou mutações de RNAt. A atividade dos complexos I e IV pode estar reduzida na MELAS.

Para a determinação da alteração molecular específica do DNAm é necessário conhecimento dos diversos tipos de mutações, compreender as vantagens e desvantagens dos métodos laboratoriais disponíveis e escolher apropriadamente o tecido a ser testado, tendo como guia os resultados dos estudos bioquímicos^{28,44,51}. O teste molecular é possível de ser realizado em leucócitos sanguíneos, entretanto, por vezes o defeito do DNAm não pode ser confiavelmente encontrado no sangue^{28,44}. Alternativamente pesquisa-se em outros tecidos como células da mucosa oral, sedimento urinário e músculo esquelético^{28,50}.

2.6. MUTAÇÃO m.3243A>G

2.6.1. ALTERAÇÃO GENÉTICA

Goto *et al.* e Kobayashi *et al.*, independentemente, relataram a primeira mutação encontrada em pacientes com MELAS em 1990^{53,54}. Eles descreveram uma mutação de ponto do DNAm_t no gene MT-TL1 que codifica o RNAt^{Leu(UUR)} na posição 3243, onde ocorre a transição de A por G (m.3243GA>G).

FIGURA 5. Mutação patológica m.3243GA>G no gene MT-TL1 do DNAm_t. (Reuso adaptado com atribuição permitida por www.mitopam.org)⁴

Esse gene fica localizado na fita pesada do DNAm_t entre os nucleotídeos 3230 e 3304⁴. Ele é responsável pela transcrição do RNAt que codifica os códons UUR (onde R= A ou G) da leucina. É uma região de alta incidência de mutações mitocondriais patogênicas, apresentando 12 mutações de ponto patogênicas descritas responsáveis por várias manifestações clínicas (MITOMAP, www.mitomap.org)⁴. A mutação m.3243A>G acarreta comprometimento da terminação da transcrição, aminoacilação ineficiente, redução da estabilidade e do processamento de RNA e conformação anormal do RNAt⁵⁵. Essas disfunções acarretam redução do nível de estabilidade do RNAt normal aminoacilado, redução da síntese proteica mitocondrial e redução da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória.

A mutação m.3243A>G ocorre na posição de oscilação (*wobble position*) do anticódon do RNAt^{Leu(UUR)}^{22,56}. Em indivíduos normais, sem a mutação, ocorre modificação da uridina em taurinometiluridina na posição de oscilação. Essa modificação é essencial para que ocorra adequada tradução da leucina pelo ribossomo mitocondrial, e consequentemente ocorra produção proteica normal. Essa posição oscilante permite que o anticódon do RNAt^{Leu(UUR)} ligue-se normalmente aos códons UUA e UUG para a formação de leucina²². Já nos pacientes com a mutação m.3243A>G, essa modificação da uridina não ocorre, o que leva a incapacidade de formar códon-anticodon com UUG⁵⁶. Além disso, também observou-se que ocorre um efeito negativo também na decodificação do códon UUA, independente da deficiência da modificação da uridina, possivelmente devido à maior fragilidade das estruturas moleculares causada pela mutação⁵⁶. Kirino *et al.* postulam que esses efeitos levam a tradução errada da leucina, reduzindo a taxa de síntese proteica, e são o fator molecular chave responsável pelas características clínicas da MELAS⁵⁵.

Apesar do menor uso do códon UUG na maioria das proteínas, a subunidade ND6 do complexo I da cadeia respiratória contém oito códons UUG, o que representa 42,1% do total de códons de leucina e 4,6% do total de códons da subunidade⁵⁶. Esse fato pode explicar porque caracteristicamente ocorre uma redução importante da atividade do complexo I nos pacientes com MELAS.

Um ano após a descrição da mutação m.3243A>G, foi relatada a descoberta da segunda mutação de ponto encontrada em pacientes com MELAS: substituição de T por C na posição 3271(m.3271T>C) do gene MT-TL1⁵⁷. Nos anos subsequentes outras mutações patogênicas relacionadas à MELAS foram descritas em diversos genes, incluindo o MT-TL1, MT-ND5, MT-TF, MT-TH, MT-TK, MT-TQ, MT-TS1, MT-TS2, MT-ND1 e MT-ND6, além de deleções do DNAm⁵⁸. Apesar de atualmente cerca de 30 mutações do DNAm relacionada a MELAS já terem sido descritas, a m.3243A>G é a mais frequente, sendo responsável por 80% dos casos de MELAS^{58,59}. A segunda mais frequente é a m.3271T>C, responsável por aproximadamente 10% dos casos, seguida pela m.13513G>A(<10%), m.3260A>G (5%), m.3252A>G (< 5 %)^{58,60}. Atualmente, existem, ao menos, 29 mutações de ponto do DNAm distintas associadas a MELAS⁵⁸.

A m.3243A>G é uma das mutações mitocondriais patogênicas mais comuns, com prevalência de 0,18 a 236/100000 indivíduos¹⁻³. Entretanto, ela não é específica para a síndrome completa da MELAS e tem sido frequentemente associada a surdez, diabetes mellitus e cardiomiopatia com herança materna¹. Apenas indivíduos cuja heteroplasmia em órgãos

importantes é maior do que 50% ou maior se apresentarão com MELAS ou um fenótipo mais grave⁶¹. Além disso, vários parentes maternos de pacientes com MELAS, podem ser portadores assintomáticos dessa mutação. Isso evidencia o caráter fenotípico heterogêneo das doenças mitocondriais, o qual está, em parte, relacionado ao nível de heteroplasmia e efeito limiar de manifestação^{18,30}. Devido ao amplo espectro fenotípico existente entre os pacientes com essa mutação, o índice de suspeição clínica é fator chave para que não haja subdiagnóstico dessa doença. A falha no diagnóstico de pacientes com essa alteração genética implica em menor vigilância das possíveis alterações clínicas que podem surgir com potenciais sequelas graves (como a cardiomiopatia).

Em 2013, Nesbitt *et al.* sugeriram que um paciente deveria ser submetido a rastreio para a mutação m.3243A>G caso qualquer um dos critérios fosse preenchido: 1.MELAS, MIDD ou síndromes sobrepostas; 2.história familiar materna da m.3243A>G; 3.três ou mais características clínicas, sem outro diagnóstico etiológico definido (cardiomiopatia, surdez, atraso do desenvolvimento ou declínio cognitivo, diabetes mellitus, epilepsia, migrânea, CPEO, retinopatia e distúrbios gastrointestinais - constipação e/ou síndrome do intestino irritável)⁶². Eles concluíram que ao se utilizar um critério mais amplo (que incluía outros pacientes que não se apresentam com síndrome clássica de MELAS), todos os pacientes incluídos na coorte realizada por eles seriam diagnosticados com a mutação, já que apenas 10% dos indivíduos fechavam critério diagnóstico de MELAS.

2.6.2. MELAS

Em 1975, começaram a ser relatados os primeiros casos sugestivos da síndrome clínica de MELAS (acrônimo do inglês *Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*)⁶³. Nesses casos, os pacientes apresentavam um quadro multissistêmico caracterizado por miopatia mitocondrial associada a deterioração neurológica progressiva, cefaleia, vômitos episódicos, atraso de desenvolvimento, lactato elevado no sangue urina e LCR, áreas focais de degeneração cortical cerebral e calcificações no globo pálido, além de sinais de insuficiência cardíaca e distúrbios de condução cardíaca. Em 1984, a síndrome foi melhor caracterizada por Pavlakis *et al.* com a descrição de dois pacientes e revisão de outros nove casos publicados nos anos anteriores⁶⁴. Os pacientes apresentavam em comum o quadro de

desenvolvimento inicial normal, baixa estatura, miopatia mitocondrial (revelada pelo achado de RRF e redução da atividade da COX à biópsia muscular e outras alterações mitocondriais reveladas por microscopia eletrônica), acidose láctica e insultos cerebrais recorrentes (caracterizados por hemiparesia, hemianopsia e cegueira cortical, além de convulsões) que se assemelhavam a acidentes vasculares cerebrais (AVC). O termo MELAS foi então introduzido para a definição de uma síndrome clínica distinta das demais síndromes mitocondriais descritas até aquela data⁶⁴.

A presença de sinais de disfunção mitocondrial revelados por achados de patologia indicou a direção dos próximos trabalhos para revelar qual o insulto bioquímico primário da MELAS. Ainda em 1986, demonstrou-se que havia redução da atividade do complexo I da cadeia respiratória e que os pacientes com MELAS poderiam apresentar melhora clínica e dos parâmetros bioquímicos com o uso da CoQ10⁶⁵⁻⁶⁷.

Em 1990, foi descrita a mutação de ponto do DNAm localizada no gene MT-TL1 na posição do nucleotídeo 3243, onde ocorre a transição de adenina (A) por guanina (G)^{54,57}. Nos anos subsequentes, outras mutações associadas a MELAS foram descritas, como a substituição de timina (T) por citosina (C) na posição 3271 do gene MT-TL1 e outras menos comuns⁵⁷.

O primeiro caso de MELAS no Brasil foi relatado por Werneck et al em 1987⁶⁸. Após esse primeiro relato, outros casos brasileiros foram descritos em três novas publicações⁶⁹⁻⁷¹.

A partir da descrição *postmortem* de um dos casos índice revisão de 69 casos publicados previamente com o quadro de MELAS, Hirano *et al.* apresentaram os critérios diagnósticos para essa síndrome em 1992 (Tabela 1)⁷². O diagnóstico de MELAS deveria incluir todos os critérios obrigatórios e, ao menos, dois critérios de suporte.

TABELA 1. Critérios diagnósticos de MELAS (Hirano *et al.*, 1992)⁷²

Critérios absolutos:

1. Episódios semelhantes a AVC antes dos 40 anos de idade;
2. Encefalopatia caracterizada por convulsões, demência ou os dois;
3. Acidose láctica, RRF ou os dois.

Critérios de suporte (ao menos 2):

1. Desenvolvimento inicial normal
2. Vômitos recorrentes
3. Cefaleia Recorrente

A síndrome incompleta, não apresentando eventos semelhantes AVC, também foi caracterizada nessa revisão de literatura, descrita frequentemente em parentes de pacientes com a síndrome completa ou em casos esporádicos.

Em 2012, Yatsuga *et al.* publicaram os critérios diagnósticos de MELAS utilizados em uma coorte japonesa (Tabela 2)².

TABELA 2. Critérios diagnósticos de MELAS no Japão (Yatsuga *et al.*, 2012)²

Categoria A

1. Dor de cabeça ou vômitos
2. Convulsões
3. Hemiplegia
4. Cegueira cortical ou hemianopsia
5. Lesão focal aguda evidenciada por imagem cerebral^a

Categoria B

1. Alto nível de lactato no plasma e/ou no LCR ou deficiência da atividade das enzimas mitocondriais^b
2. Biópsia muscular com anormalidades mitocondriais^c
3. Mutação genética definitivamente relacionada a MELAS^d

MELAS Definitivo

Dois itens da Categoria A e dois itens da Categoria B (4 itens ou mais)

MELAS suspeito

Um item da Categoria A e dois itens da Categoria B (ao menos 3 itens)

^a Anormalidades cerebrais focais na TC e/ou RNM

^b Lactato ≥ 2 mmol/L (18 mg/dl) no plasma em repouso ou no LCR e/ou deficiência das enzimas da cadeia transportadora de elétrons, relacionadas ao piruvato, relacionadas ao CAT ou relacionadas ao metabolismo de lipídeos em células somáticas (preferência por células musculares)

^c RRF na coloração tricrômico de Gomori modificada e/ou SDH fortemente reativa, fibras COX negativas ou mitocôndrias anormais na microscopia eletrônica

^d Mutação genética mitocondrial definitiva relatada na literatura

Apesar do quadro cérebro-muscular preponderar nos quadros de MELAS, outras manifestações também são frequentemente associadas, refletindo sua fisiopatogenia multissistêmica, como disfunções cardíacas, endócrinas, hepáticas, renais e visuais (Tabela 3)^{20,28,58}.

TABELA 3. Manifestações multissistêmicas na MELAS^{20,28,58}

Sistema	Manifestações Clínicas
Sistema Muscular	Fraqueza muscular proximal Intolerância ao exercício Dor muscular Hipotonia Fadiga Cãimbras Oftalmoplegia externa progressiva Ptose palpebral

Sistema Nervoso	Eventos semelhantes a AVC Demência Dificuldade escolar Convulsões Coma episódico Mioclonia e outros distúrbios de movimento Transtornos Neuropsiquiátricos e desordens do humor Cegueira Cortical Cefaleia / Migrânea Surdez Ataxia Neuropatia periférica
Sistema Endocrinológico	Baixa estatura Hirsutismo Diabetes Mellitus Hipotireoidismo Hipoparatiroidismo
Sistema Gastrointestinal	Desconforto abdominal Vômitos recorrentes Constipação Diarreia Pseudobstrução intestinal Pancreatite recorrente
Sistema Renal	Síndrome de Fanconi Síndrome nefrótica Glomeruloesclerose focal e segmentar Insuficiência Renal crônica
Olhos	Retinite pigmentosa Atrofia óptica
Sistema Cardiovascular	Distúrbios de condução Síndrome de Wolff-Parkinson-White Hipertrofia Ventricular Esquerda Cardiomiopatia Dilatada Insuficiência Cardíaca

2.6.3. ESPECTRO FENOTÍPICO DA MUTAÇÃO m3243A>G

A MELAS é uma desordem multissistêmica que se inicia tipicamente na infância, por volta de 2 a 10 anos, após um desenvolvimento inicial normal, apesar de ser comum a apresentação de

baixa estatura. Alguns indivíduos têm início de sintomas entre 10 a 40 anos, sendo muito raro o início após os 40 anos de idade^{58,73}.

Os sintomas iniciais mais comuns são convulsões, cefaleia e vômitos recorrentes, intolerância a exercícios e fraqueza proximal. Os eventos semelhantes a AVC são recorrentes e caracterizados por hemiparesia, cegueira cortical ou alteração da consciência transitórias e estão frequentemente associados ao surgimento de crises convulsivas⁷⁴. O efeito cumulativo desses eventos semelhantes a AVC levam a uma deterioração motora, visual, auditiva e cognitiva nos pacientes ainda adultos jovens⁷⁵⁻⁷⁸. Migrânea, neuropatia periférica e sintomas psiquiátricos também ocorrem na maioria dos indivíduos afetados^{74,79-81}.

Demência pode ocorrer em 40% a 90% dos pacientes, secundária à disfunção metabólica cerebral e ao efeito cumulativo de lesões corticais⁸². Epilepsia - em geral de natureza focal, mas também apresentando-se de forma primariamente generalizada - é outra manifestação comum, atingindo 71% a 96% dos pacientes com MELAS⁸². Cefaleia recorrente atinge de 54% a 91% desses pacientes, frequentemente manifestando-se como migrânea associada a eventos de vômitos e é mais grave durante os episódios semelhantes a AVC⁸². Os distúrbios psiquiátricos mais frequentes são depressão, ansiedade, psicose, transtorno bipolar e mais raramente alterações comportamentais e transtornos de personalidade borderline^{74,79,83}.

Outros sintomas comuns incluem ataxia, coma episódico, atrofia óptica, cardiomiopatia, distúrbios de condução cardíaca, retinopatia pigmentosa, oftalmoplegia, diabetes mellitus, hirsutismo, dismotilidade gastrointestinal, disautonomia e nefropatia^{58,80,84-89}. Mioclonias e outros distúrbios do movimento, incluindo parkinsonismo rigidoacínético e distonias também são relatados⁹⁰. Achados oculares como oftalmoplegia e atrofia do epitélio pigmentar da mácula foram descritos em quatro membros de uma família com a mutação m.3243A>G⁹¹. Alterações craniofaciais e insuficiência respiratória fulminante também já foram relatadas^{92,93}.

O espectro clínico da MELAS envolve uma enorme gama de manifestações clínicas que podem estar combinadas de diversas formas. É possível a observação de indivíduos que expressam a síndrome clássica de MELAS (apresentando eventos semelhantes a AVC) e indivíduos portadores da mutação que são assintomáticos. Entre esses dois extremos há indivíduos que se apresentam dentro de um espectro clínico de manifestações que sugerem disfunção mitocondrial, que podem variar em intensidade desde leve até comprometimento grave, apesar de não apresentarem eventos semelhantes a AVC⁸⁰.

Casos atípicos de indivíduos que apresentam apenas uma manifestação clínica, como surdez e diabetes mellitus, ou apresentam uma síndrome clínica diversa como a MIDD, OPEC e MERRF também já foram relatados⁹⁴⁻⁹⁸.

Raramente a síndrome pode se manifestar mimetizando quadros infecciosos do sistema nervoso central (SNC), em especial a encefalite herpética⁹⁹⁻¹⁰⁴. Os pacientes apresentam-se com sinais de comprometimento neurológico central focal e/ou alteração do nível de consciência e comportamental associados a febre. O diagnóstico definitivo de MELAS só pode ser feito após extensiva avaliação laboratorial negativa para etiologia infecciosa.

As causas mais comuns de morte entre os pacientes com MELAS incluem eventos cardíacos, *status epilepticus*, eventos semelhantes a AVC, pneumonia aspirativa ou sepse, íleo paralítico e acidose metabólica¹⁰⁵. Em 2015, Ng *et al.* descreveram dois casos de morte súbita em pacientes com a mutação m.3243A>G e revisaram mais 14 casos de morte documentados nos 6 anos anteriores na coorte inglesa *Newcastle MRC (Medical Research Council Center Mitochondrial Disease Patient Cohort)*^{62,105}. Os dois casos apresentados por esse grupo eram pacientes identificados como portadores assintomáticos da mutação (um deles era parente de primeiro grau de paciente com MELAS) com alta carga de DNAm na urina e encontravam-se em bom estado de saúde até 12 horas antes do óbito. À autópsia, os dois pacientes apresentaram exuberante evidência de deficiência da OXPHOS em múltiplos órgãos, especialmente no coração. Devido ao bom estado de saúde dos dois pacientes, a causa da morte súbita foi provavelmente uma arritmia cardíaca. Um dos pacientes havia ingerido pequena quantidade de álcool no dia do óbito (alcoolemia de 63 mg/dL), indicando uma possível hipersensibilidade desses pacientes ao álcool¹⁰⁶. Após a revisão dos 14 casos documentados na coorte inglesa, foram identificados seis pacientes previamente assintomáticas ou com sintomas leves que apresentaram morte súbita. Nesse estudo, Ng *et al.* estimaram que a taxa de mortalidade de todas as causas de morte em pacientes com a mutação m.3243A>G é de 17/1000 pessoa/ano e a de morte súbita nessa população é de 2,4/1000 pessoa/ano¹⁰⁵.

Comprometimento cardíaco, frequentemente manifestado como cardiomiopatia e/ou alterações da condução, ocorre em 20% a 50% dos pacientes com doença mitocondrial relacionada à mutação m.3243A>G e é um preditor independente de morbidade e mortalidade precoce nesses pacientes^{105,107-109}. Tanto a cardiomiopatia hipertrófica quanto a dilatada já foram observadas em pacientes com MELAS, porém o achado mais típico é de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) concêntrica não obstrutiva⁸². A cardiomiopatia dilatada é um fenótipo raro¹¹⁰. As alterações da condução cardíaca incluem a síndrome de Wolff-Parkinson-White (WPW),

taquicardia supraventricular, fibrilação atrial e alterações da repolarização. Majamaa-Voltti *et al.* avaliaram com ecocardiograma 39 pacientes com essa mutação e identificaram que 19 apresentavam HVE e 1 paciente com cardiomiopatia congestiva sem HVE; monitoraram com Holter 36 pacientes e identificaram que 5 apresentavam extrassístoles ventriculares frequentes, 1 apresentava episódios de extrassístoles ventriculares não sustentadas, 1 apresentava bloqueio de condução átrio-ventricular e outro a síndrome de WPW¹¹⁰. Apesar das alterações cardiovasculares, foi evidenciado que exercícios aeróbicos trazem benefícios para esses pacientes¹¹¹.

Sintomas e sinais de disfunção autonômica são comumente relatados em pacientes com doenças mitocondriais, incluindo hipotensão ortostática, impotência sexual masculina, disfunção urinária, dismotilidade gastrointestinal e disfunção pupilar¹¹². Cerca de 80% dos pacientes com MELAS e mais de 60% dos portadores da mutação m.3243A>G apresentam um ou mais sintomas de disautonomia; sendo os sintomas mais comuns os gastrointestinais (66%), seguidos dos sintomas relacionados a hipotensão ortostática (40%)⁸⁷.

Esses pacientes também apresentam nefropatia, comumente relatada como disfunções tubulares (incluindo síndrome de Fanconi, acidose tubular renal e nefrite tubulointersticial), proteinúria (por vezes chegando a níveis de síndrome nefrótica) e insuficiência renal crônica¹¹³. Estudos histológicos evidenciaram que a glomeruloesclerose segmentar e focal é a lesão mais comumente encontrada em biópsias renais de pacientes com MELAS, frequentemente associada a alteração arteriolar hialina^{89,113}.

Existem apenas dois casos de homoplasmia (100% de mutação m.3243A>G) relatados: um caso de síndrome de VACTERL (*vertebral, anal, cardiovascular, tracheo-esophageal, renal, and limb defects*) e um caso de câncer de colon^{114,115}. Pacientes com a mutação da MELAS não parecem ter um risco aumentado para câncer, quando comparados à população geral¹¹⁶.

Disfunções mitocondriais podem ter um papel fundamental na infertilidade masculina. Estudos revelam que a disfunção da OXPHOS e o acúmulo de radicais livres afetam negativamente a concentração dos espermatozoides (devido à apoptose e parada da espermatogênese), morfologia e, principalmente, a mobilidade dessas células¹¹⁷⁻¹²².

Estudos populacionais recentes vêm revelando o amplo espectro clínico apresentado por pacientes com a mutação m.3243A>G. Em 2004, Chae *et al.* realizaram uma investigação de 85 casos de encefalomiopatia mitocondrial na Coreia, dentre os quais foram detectados 19 indivíduos com essa mutação¹²³. Dos pacientes com m.3243A>G, 14 apresentavam o fenótipo

clássico de MELAS e cinco apresentavam manifestações clínicas heterogêneas, como epilepsia isolada ou MIDD.

Em 2009, num estudo realizado nos Estados Unidos com 45 famílias que continham 123 indivíduos com a mutação m.3243A>G (sendo 45 com MELAS e 78 portadores da mutação) e 30 indivíduos controles, Kaufmann *et al.* identificaram também que 60% dos familiares de indivíduos com MELAS que eram portadores da mutação apresentavam sintomas sugestivos de disfunção mitocondrial em pelo menos dois órgãos e sistemas⁸⁰.

Em 2010, foi publicado um estudo com 47 famílias chinesas que apresentavam a mutação m.3243A>G¹²⁴. Foram incluídos 47 pacientes sabidamente com a mutação, além das 47 mães e 14 irmãos dos pacientes. Nesse estudo, Ma *et al.* identificaram que as mães dos pacientes apresentavam quadro clínico de menor gravidade ou eram assintomáticas, e que isso tinha associação com a quantidade de DNAm^t mutante encontrado no sangue e na urina, que era três e duas vezes menor, respectivamente, do que a encontrada nos pacientes.

Em 2011, foi publicada uma coorte realizada com 31 indivíduos com MELAS e 54 portadores sintomáticos e assintomáticos por um período de 10,6 anos, onde Kaufmann *et al.* evidenciaram declínio significativo do exame neurológico, testes neuropsicológicos e escores de atividades da vida diária em todos os pacientes com MELAS, além disso, foi evidenciada também uma menor sobrevida no grupo dos indivíduos que apresentavam a síndrome completa de MELAS⁷⁷.

Em 2012, foi publicado um estudo japonês realizado através de questionários contando com a participação de 2236 Departamentos de Neurologia do Japão². Nesse trabalho, Yatsuga *et al.* identificaram 233 casos de MELAS (definidos pelos critérios diagnósticos japoneses). A prevalência da doença naquele país foi de 0,18/100.000 indivíduos. Desses pacientes, 96 foram seguidos numa coorte que durou 5 anos. Foi demonstrada maior gravidade da doença e maior taxa de mortalidade naqueles pacientes que tiveram início da doença antes dos 18 anos de idade.

No mesmo ano, foi publicado um estudo holandês realizado com 34 famílias com a mutação m.3243A>G (incluídos 127 pacientes, dentre eles 82 parentes maternos de pacientes com a mutação)⁴⁹. Nesse trabalho, Laatz *et al.* identificaram que MIDD (31 pacientes) era uma apresentação clínica muito mais prevalente do que MELAS (17 pacientes). Eles introduziram também um novo termo para nomear indivíduos com mutação mitocondrial sem sinais evidentes de disfunção mitocondrial: portadores latentes. Essa nova nomenclatura foi dada porque portadores de mutações do DNAm^t podem num determinado momento da vida se tornar

sintomáticos; diferentemente da nomenclatura Mendeliana, onde portadores de mutações recessivas em um alelo em geral não apresentarão sinais e sintomas clínicos.

Em 2013, foi publicada a coorte *Newcastle* MRC que incluiu 129 pacientes de 83 famílias inglesas que apresentavam a mutação m.3243A>G⁶². Nesbitt *et al.* identificaram um espectro fenotípico dos indivíduos estudados, sendo que 10% apresentaram o fenótipo clássico de MELAS, enquanto que 30% apresentaram MIDD, 6% CPEO e 3% surdez neurosensorial isolada. Ainda foram relatados indivíduos com síndromes sobrepostas: 6% MELAS/MIDD, 2% MELAS/CPEO e 5% MIDD/CPEO. Vinte e oito por cento dos indivíduos apresentaram características clínicas que não configuravam uma síndrome clínica definida e 9% eram assintomáticos.

O primeiro caso brasileiro de MELAS foi publicado por Werneck *et al.* em 1987⁶⁸. Foi relatado o caso de uma criança de 12 anos de idade que apresentava convulsões, cefaleia, vômitos recorrentes e sinais neurológicos focais. Em 2007, Conforto *et al.* realizaram um estudo de rastreio de mutações relacionadas à MELAS em pacientes jovens que tiveram AVC em São Paulo, no qual foram identificados 3 pacientes com a mutação m.3243A>G⁷⁰. Werneck *et al.* publicaram em 2009 uma série de 10 casos de pacientes brasileiros com a síndrome completa de MELAS⁷¹. Desses, quatro eram portadores da mutação m.3243A>G e os demais não tiveram mutações identificadas pelas técnicas metodológicas utilizadas no estudo. Além dos eventos semelhantes a AVC, os sintomas mais comuns foram vômitos recorrentes, cefaleia, convulsões, fraqueza, demência, surdez, baixa estatura, sintomas oculares, ataxia e paresia facial, em ordem decrescente de frequência. Em 2016, Souza *et al.* publicaram o primeiro caso de mielite transversa longitudinalmente extensa associada à mutação m.3243A>G¹²⁵.

2.6.4. FISIOPATOLOGIA DOS EVENTOS SEMELHANTES A AVC

Os pacientes com a mutação m.3243A>G podem apresentar eventos semelhantes a AVC caracterizados por déficits neurológicos que se correlacionam com alterações na RNM, caracterizadas por lesões laminares corticais multifocais hiperintensas em imagens pesadas em difusão, que não respeitam um padrão territorial vascular. A etiologia desses eventos ainda não foi completamente explicada, porém algumas hipóteses são defendidas para explicar esses

eventos. As principais referem-se a uma hipótese de falência energética e a outra refere-se a uma disfunção endotelial.

De acordo com a hipótese de angiopatia mitocondrial, as lesões têm natureza isquêmica e seriam causadas por uma disfunção endotelial. Uma das funções do endotélio é produzir óxido nítrico (NO), substância que tem o maior papel no relaxamento da musculatura lisa, necessário para manter os vasos sanguíneos abertos. A disfunção endotelial resulta em redução do NO. Além disso, a proliferação mitocondrial endotelial pode levar a aumento da atividade da COX, que pode se ligar ao NO e sequestrá-lo. Tanto a redução da produção do NO pelo endotélio quanto seu sequestro pela COX reduzem sua disponibilidade no SNC^{126,127}. Ainda, pode haver conversão de NO em espécies reativas a oxigênio (radicais livres) e redução de arginina e citrulina, precursores do NO. Todos esses fatores somados causariam microangiopatia, com consequente hipoperfusão cerebral e acidose láctica devido à baixa disponibilidade tecidual de oxigênio. Entretanto, alguns estudos realizados com RNM de perfusão, tomografia por emissão de pósitrons (do inglês, PET) e tomografia por emissão de fóton único (do inglês, SPECT - *Single-Photon Emission Computed Tomography*) têm demonstrado evidência de hiperemia nas lesões do SNC em pacientes com MELAS e não edema citotóxico como é comum nas lesões primariamente isquêmicas¹²⁸.

A hipótese que se contrapõe à da angiopatia mitocondrial refere-se aos mecanismos de disfunção energética celular mediados pela mitocôndria. Como já descrito anteriormente, a mutação do DNAm responsável pela MELAS leva à redução da síntese proteica e disfunção da OXPHOS, principalmente por deficiência do complexo I, com consequente falência energética por depleção celular de ATP¹²⁹. Estudos realizados com PET demonstraram que, em pacientes com encefalopatia mitocondrial grave, há uma mudança do padrão de utilização da glicose, de modo que ocorre aumento da glicólise anaeróbica em detrimento da oxidação aeróbica da glicose¹³⁰⁻¹³². Recentemente, Lindroos *et al.* realizaram um estudo com imagens de RNMe que evidenciou uma redução de 26% do metabolismo de oxigênio do córtex em todas as regiões do cérebro de pacientes com a mutação m.3243A>G (sintomáticos e assintomáticos) em relação aos controles sem a mutação¹³³. Tais achados sugerem comprometimento global da cadeia respiratória mitocondrial no cérebro de indivíduos com a mutação m.3243A>G. Além disso, foi demonstrado hipometabolismo da glicose na região occipital do cérebro dos pacientes com a mutação, não havendo diferença significativa em relação ao fluxo sanguíneo cerebral dos controles.

2.6.5. CONFIRMAÇÃO DIAGNÓSTICA

Um fator chave para o diagnóstico das doenças causadas pela mutação m.3243A>G é manter um alto índice de suspeição diante de quadros multissistêmicos, ou até em casos oligossintomáticos com história familiar de herança materna. O diagnóstico clínico é alicerçado por exames laboratoriais e de imagem e confirmado por teste molecular e, se necessário, biópsia muscular.

2.6.5.1. EXAMES LABORATORIAIS

Acidose láctica é um dos sinais cardinais da síndrome de MELAS. Cerca de 90% dos pacientes com a síndrome apresentam níveis altos de lactato no sangue e no LCR e relação lactato/piruvato aumentada^{97,129}. O aumento de lactato reflete a inabilidade das mitocôndrias disfuncionais para a produção de ATP por via da fosforilação oxidativa, de modo que ocorre maior conversão de piruvato em lactato pela lactato desidrogenase⁴⁶. Em geral, esses níveis podem estar excessivamente elevados após exercício moderado a extenuante, durante eventos que cursam com alta demanda metabólica, como infecções, e durante episódios de comprometimento neurológico grave, como crises convulsivas e eventos semelhantes a AVC^{71,77,80}.

A creatina quinase (CK) sérica pode estar aumentada, tipicamente em níveis moderados, e é um marcador não específico de lesão muscular. Níveis maiores do que 1000U/l são raros, mas podem ocorrer, principalmente na presença de nefropatia ou crises convulsivas⁵¹. Outros exames que podem estar alterados nos indivíduos com MELAS são as transaminases hepáticas, glicemia, hemoglobina glicosilada, creatinina sérica e urinária, ureia e hormônios tireoidianos⁸⁰.

O exame eletroneuromiográfico evidencia alterações consistentes com processo miopático, mas neuropatia predominantemente sensitiva axonal pode coexistir, sendo um achado relativamente comum⁸¹.

Como referido anteriormente, cardiomiopatia e distúrbios de condução cardíaca são comuns em pacientes com MELAS. Em 2015, Ng *et al.* propuseram uma rotina para avaliação

cardíaca dos pacientes portadores da mutação m.3243A>G¹⁰⁵. Todos devem ser submetidos a uma avaliação basal com ECG e ECO e ter determinada sua classificação de risco para eventos cardíacos graves considerando: 1.sintomas de insuficiência cardíaca ou síncope não explicadas; 2.história familiar materna de morte súbita; 3. ECG anormal ou HVE e 4.risco de cardiomiopatia baseado na heteroplasmia sanguínea e gênero. Pacientes são considerados de alto risco quando apresentarem qualquer um dos itens anteriores e devem ser encaminhados ao cardiologista para seguimento e avaliação ampliada com RNM cardíaca e Holter. Pacientes de baixo risco para eventos cardíacos devem ser submetidos a avaliação com ECG e ECO a cada 12 ou 24 meses.

2.6.5.2. NEUROIMAGEM

Exames de neuroimagem são úteis para o suporte diagnóstico de MELAS, ainda que não apresentem alta especificidade ou sensibilidade para doenças mitocondriais.

A manifestação clínica mais característica da síndrome de MELAS é o evento semelhante a AVC, que cursa com lesões multifocais semelhantes a infartos, com envolvimento cortical e subcortical, podendo simular uma lesão isquêmica. Entretanto, tais lesões não respeitam um território vascular e tendem a se estender progressiva e lentamente¹³⁴. Podem ocorrer em qualquer área do cérebro, entretanto, existe uma predileção de acometimento do lobo occipital seguido pelos lobos temporal e parietal.

A RNM revela lesões semelhantes a AVC, com prolongamento do tempo de relaxamento em T1 e T2, o que pode sugerir diagnóstico de AVC. As sequências de imagem pesada em difusão (do inglês, DWI) e coeficiente aparente de difusão (do inglês, ADC) são bastante úteis para distinguir essas duas hipóteses diagnósticas (lesões isquêmicas ou secundária a insulto metabólico) no contexto de déficit neurológico agudo associado a lesão encefálica com hipersinal de T2. Nas lesões isquêmicas, há restrição à difusão causada por edema citotóxico, e o sinal no mapa ADC aparecerá reduzido. Já nas lesões causadas pela MELAS, que mais frequentemente decorrem de edema vasogênico, o sinal do mapa ADC não é reduzido completamente ou é menos reduzido do que o sinal na DWI¹³⁵. Alguns autores também relataram o achado de redução do ADC nas fases iniciais dessas lesões, indicando um processo citotóxico precoce que seria seguido por edema vasogênico posteriormente¹³⁶.

Os achados característicos de MELAS na RNMe são a redução do NAA e o surgimento de pico anômalo de lactato, que reflete o metabolismo anaeróbico e é encontrado mesmo em regiões cerebrais sem lesões evidentes¹³⁶. Weiduschat *et al.* descreveram que em pacientes com a mutação m.3243A>G que não desenvolveram a síndrome completa de MELAS, paradoxalmente, pode-se encontrar níveis normais ou até aumentados de NAA na substância cinzenta profunda, e postulou que esse achado pode ser consequência de um efeito compensatório da disfunção energética local que leva à proliferação mitocondrial¹³⁷. Imagens de SPECT revelam hiperperfusão até aproximadamente 1 mês do início do evento semelhante a AVC e hipoperfusão na fase crônica¹³⁶. Estudo realizado com PET demonstrou uma dissociação entre o consumo de oxigênio e o metabolismo da glicose nos cérebros de indivíduos com MELAS, de modo que havia uma redução drástica de consumo de oxigênio globalmente no cérebro, em contraste ao consumo de glicose relativamente preservado¹³³.

Estudos com autópsias de pacientes com MELAS evidenciaram necrose cortical laminar, achado também comum em outras condições patológicas secundárias à hipóxia, isquemia, hiperamonemia ou por episódios de alta demanda metabólica, como estado de mal epilético¹³⁸. Na RNM, a necrose cortical laminar é caracterizada por hipersinal focal ou difuso permanente nas imagens pesadas em T1 e em FLAIR (*fluid attenuation inversion-recovery*), que segue a anatomia dos giros do córtex cerebral.

Os estudos de neuroimagem relacionados à MELAS em geral são focados nos achados de lesões semelhantes a AVC. Existem, até o momento, poucos estudos que caracterizam sistematicamente os achados de neuroimagem em indivíduos portadores da mutação m.3243A>G que não apresentam clinicamente a síndrome clássica de MELAS. Tschampa *et al.* descreveram em 2013 os achados de neuroimagem de 11 pacientes com a mutação m.3243A>G, sendo que 7 deles apresentavam o fenótipo incompleto da MELAS (caracterizados pela ausência de episódios semelhantes a AVC)¹³⁹. Foi descrito o achado de anormalidades na substância cinzenta profunda em 50% daqueles com a síndrome completa e em 71% daqueles com a síndrome incompleta. Essas lesões eram caracterizadas por hipersinal em imagens pesadas em T1, hipossinal em imagens pesadas em T2 e calcificações reveladas por TC. Predominantemente, localizavam-se no globo pálido externo, putâmen, pulvinar do tálamo e núcleo denteado do cerebelo. Além disso, relataram também o achado de anormalidades na substância branca, que predominavam no lobo occipital e eram mais prevalentes nos indivíduos com MELAS clássica. Atrofia encefálica, com predomínio cerebelar, foi observada em 91% dos indivíduos estudados.

A evidência de imagens com hipossinal em T2 na substância cinzenta profunda, notadamente no globo pálido e substância negra, representa depósitos de ferro e/ou cálcio. Desse modo, o uso sistemático de RNM pesadas em T2 torna-se uma importante ferramenta diagnóstica, principalmente em casos de pacientes jovens que ainda não apresentaram lesões típicas de MELAS, já que esses depósitos são frequentemente idade dependente e incomuns nessa faixa etária¹⁴⁰.

Apesar de o envolvimento da substância branca profunda na MELAS não ser um conceito novo, existem poucos relatos que descrevem esse fenômeno¹⁴¹. Um estudo realizado através de análise baseada em *voxel* de RNM pesadas em DWI de pacientes com a mutação m.3243A>G evidenciou alterações microestruturais da substância branca, com predomínio em regiões posteriores e caudais do encéfalo, e uma redução global do volume encefálico¹⁴².

2.6.5.3. TESTE MOLECULAR

O teste molecular confirma o diagnóstico da mutação m.3243A>G. Pode ser realizado por pesquisa direta da mutação ou através do sequenciamento do DNAm⁵⁸. A mutação pode ser detectada usualmente em todos os tecidos, o que torna possível sua pesquisa em leucócitos sanguíneos em indivíduos com quadros típicos. Entretanto, a mutação pode apresentar distribuição tecidual variada e tornar-se indetectável no sangue. Nessas situações, outros tecidos devem ser analisados, como folículo piloso, sedimento urinário e o próprio músculo esquelético⁴⁹.

2.6.5.4. BIÓPSIA MUSCULAR E ENSAIOS ENZIMÁTICOS DA CADEIA RESPIRATÓRIA

O diagnóstico de MELAS pode ser confirmado pelos achados histopatológicos musculares. A coloração tricrômico de Gomori modificada revela as RRF, áreas irregulares de acúmulo mitocondrial intermiofibrilar e subsarcolemal que aparecem como grânulos avermelhados. Usualmente, essas fibras apresentam-se com coloração positiva para COX; diferentemente do

que ocorre em outras síndromes mitocondriais como MERRF, Kearns-Sayre e CPEO. As RRF também se apresentam com coloração azul intensa na reação da SDH, o que representa disfunção mitocondrial com proliferação compensatória⁴⁴.

Através da biópsia do músculo esquelético e também por cultura de fibroblastos da pele, é possível mensurar a atividade dos complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória. A análise bioquímica da cadeia respiratória de indivíduos com MELAS em geral evidencia deficiências enzimáticas parciais múltiplas, envolvendo em especial os complexos I e IV, ou pode apresentar-se dentro da normalidade em alguns casos. O complexo II apresenta-se em geral dentro dos níveis normais, provavelmente porque é o único complexo codificado exclusivamente pelo DNAn¹⁴³.

3. JUSTIFICATIVA

As características clínicas associadas à mutação m.3243A>G encontram-se dentro de uma enorme gama de manifestações que podem estar combinadas aleatoriamente e em diversos graus de intensidade. Os indivíduos portadores dessa mutação podem apresentar desde a síndrome completa de MELAS até quadros leves com apenas uma manifestação, como depressão ou surdez. Devido à grande heterogeneidade fenotípica apresentada por portadores dessa mutação, é possível que haja subdiagnóstico dessa doença. Por essa razão, a investigação dessa mutação tem sido realizada tanto em quadros clássicos quanto em pacientes com quadros inespecíficos, nos quais há suspeita de tratar-se de uma doença mitocondrial (seja por envolvimento multissistêmico, por padrão sugestivo de herança materna ou pela observação de aumento do lactato).

A análise do quadro clínico dos pacientes diagnosticados com a mutação m.3243A>G em nossa casuística, considerando o contexto clínico dos demais casos investigados no nosso serviço, pode promover maior entendimento sobre a desordem. Apesar de passados mais de 30 anos após a definição clínica e patológica dessa síndrome, ainda existem poucos estudos sobre sua epidemiologia. Desse modo, torna-se importante a caracterização clínica dos pacientes com a mutação m.3243A>G em seguimento no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (ANEM/HCFMRP-USP). Os dados gerados poderão facilitar o aperfeiçoamento de estratégias

diagnósticas no ANEM/HCFMRP-USP, assim como contribuir para a ampliação dos conhecimentos sobre o espectro clínico da mutação mais frequentemente associada à MELAS.

4. OBJETIVOS

Identificar a frequência de diagnóstico da mutação m.3243A>G no laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental;

Descrever as características clínicas dos pacientes com quadro de encefalomiopatia associado à mutação m.3243A>G que são acompanhados no ANEM/HCFMRP-USP;

Descrever o espectro de lesões encefálicas evidenciadas por exames de neuroimagem nesses pacientes.

5. METODOLOGIA

5.1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional descritivo, retrospectivo, de casuística relacionada à análise da mutação m.3242A>G, com avaliação detalhada de uma série de casos de pacientes nos quais a mutação foi detectada.

5.2. POPULAÇÃO

Indivíduos submetidos à análise da mutação m.3243A>G no período compreendido entre maio de 2000 e maio de 2015 no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (LNAE).

Foi feita análise detalhada do quadro clínico dos pacientes que apresentaram a mutação m.3243A>G diagnosticada no LNAE do HCFMRP-USP e de seus familiares, sintomáticos ou assintomáticos, que também apresentaram a mutação.

5.3. COLETA DE DADOS

Os dados clínicos e informações sobre exames complementares foram coletados através de revisão sistemática dos prontuários médicos dos pacientes selecionados considerando os seguintes itens :

- Dados epidemiológicos: idade, sexo, procedência, data do início do seguimento no serviço, data de óbito;
- Idade de início dos sintomas, desenvolvimento neuropsicomotor; história familiar para mutação m.324A>G;
- Sinais e sintomas de miopatia: fraqueza proximal dos membros, dor muscular, intolerância aos exercícios, fadiga, câimbras, ptose palpebral e restrição da motricidade ocular;
- Sinais e sintomas de acometimento do sistema nervoso central e periférico: eventos semelhantes a AVC, crises epiléticas, cefaleia, demência, dificuldade de aprendizado, mioclonias, distúrbios do movimento, ataxia cerebelar, transtornos psiquiátricos, cegueira cortical, surdez neurossensorial, neuropatia periférica;
- Sinais e sintomas de endocrinopatias: baixa estatura para idade e curva familiar, diabetes mellitus, hipotireoidismo, hipoparatireoidismo;
- Sinais e sintomas de disautonomia: vômitos recorrentes, sinais e sintomas de hipotensão postural, síncope, dismotilidade gastrointestinal (constipação e/ou diarreia);
- Sinais e sintomas de nefropatia: alteração de creatinina e ureia (níveis considerados para lesão renal), proteinúria (desde leve até níveis considerados para síndrome nefrótica);
- Retinite pigmentosa e atrofia do nervo óptico;
- Sinais e sintomas de acometimento cardíaco: cardiomiopatia revelada por ecocardiografia, distúrbios de condução cardíaca ao eletrocardiograma;

- Outros exames complementares: lactato sérico em repouso e após esforço, CK sérica, LDH, gasometria, transaminases hepáticas, lipidograma, eletroneuromiografia;
- Biópsia muscular: análise morfológica e histoenzimológica, bioquímica da cadeia respiratória;
- Análise molecular: sangue periférico, músculo esquelético e sedimento urinário.

Os exames de neuroimagem foram revisados sob supervisão de neurorradiologista experiente para descrição das lesões encontradas, considerando-se prioritariamente os seguintes aspectos:

- Lesões semelhantes a AVC;
- Atrofia encefálica;
- Alteração de sinal em núcleos da base cerebral em sequências de T1, T2 e Flair;
- Alteração de sinal de substância branca encefálica em sequências de T2 e Flair;
- Estudos de metabólitos cerebrais (redução de NAA e pico anômalo de lactato) por espectroscopia.

5.4. PESQUISA DA MUTAÇÃO m.3243A>G

Em todos os pacientes incluídos, a pesquisa da mutação m.3243A>G foi realizada previamente à realização deste trabalho.

A região do DNAm entre os nucleotídeos foi amplificada por PCR, utilizando *primers* específicos para cada região a ser estudada. A presença de mutações de ponto será verificada através da digestão com as enzimas de restrição apropriadas para cada caso. Após digestão os fragmentos serão submetidos à eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio e observados em transiluminador com luz ultravioleta.

Para a detecção da mutação A3243G, *primers* correspondentes às regiões 3116-3134 e 3353-3333 do DNAm foram utilizados para amplificação do DNA, que foi subsequentemente submetido a digestão pela enzima de restrição HaeIII e analisado por eletroforese em gel de acrilamida 8% e coloração com nitrato de prata. O DNAm selvagem apresenta 2 pontos de

clivagem, gerando bandas de 169, 37 e 32 bp, enquanto que o mutante, com 3 pontos de clivagem, resulta em bandas de 97, 72, 37 e 32 bp.

5.5. VIESES

A casuística é pequena, entretanto, por se tratar de doença rara, as informações obtidas através deste estudo podem contribuir para aumentar o conhecimento sobre o espectro clínico relacionado à mutação m.3243A>G.

Os dados de história pregressa foram coletados através de revisão de prontuário, de modo que os dados prévios podem ser menos consistentes devido a um viés de informação e registro.

5.6. ANÁLISE DE DADOS

Descrição da população utilizando estatística descritiva, com medidas de tendência central e de dispersão e cálculo de frequências.

Teste de Kruskal-Wallis para análise de variância não-paramétricas (para comparação de características clínicas entre o grupo de pacientes com a síndrome clássica de MELAS e o grupo de pacientes que não apresentaram lesões semelhantes a AVC), sendo que o nível de significância aceito foi de 5% ou menos.

5.7. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (CAAE 52276115.6.0000.5440), sendo dispensado o pedido de consentimento formal dos pacientes, visto tratar-se de análise retrospectiva dos dados contidos em prontuário.

6. RESULTADOS

O estudo abordou pacientes em seguimento no ANEM/HCFMRP-USP no período compreendido entre maio do ano de 2000 e maio do ano de 2015 que apresentam a mutação m.3243A>G. Nesse período, a referida mutação foi avaliada em um total de 817 pacientes, em DNA extraído de células do sangue periférico (n= 441), de fragmentos de biópsia de músculo esquelético (n= 293), de ambos (n= 82) e mais raramente de células do sedimento urinário (n=1). Dentre esses, foram identificados 16pacientes de 12 famílias com a mutação m.3243A>G, resultando em uma taxa de detecção da mutação de 1,96% nessa população. Doze indivíduos de 9 famílias foram recrutados para o estudo por serem acompanhados no ANEM/HCFMRP-USP.

A Tabela 4 sumariza as características demográficas e clínicas da população estudada. As famílias estão representadas por números romanos. Os Pacientes 4 e 8 são irmãos. Os Pacientes 2 e 6 são filhos das Pacientes 11 e 9, respectivamente. O Paciente 3, falecido aos 17 anos, teve irmão com quadro semelhante que também havia falecido e a pesquisa da mutação foi positiva em sua mãe. Além disso, o Paciente 2 tem primo da família materna com história de crise epiléticas. A mãe do Paciente 5 tem história de migrânea. A mãe da Paciente 10 teve análise molecular negativa para a mutação m.3243A>G.

Os pacientes apresentaram à época da coleta dos dados (segundo semestre de 2015) idade que variou de 10 a 61 anos, com média de $36,83 \pm 13,86$ anos. Três pacientes haviam falecido, tendo sido consideradas suas idades na data do óbito. Cinco pacientes eram do sexo feminino (F) e sete do sexo masculino (M), com razão de F:M de 1:1,4 indivíduos. O Paciente 3 faleceu aos 17 anos de idade, menos de 01 mês após o início do seguimento em nosso serviço, e apresentava em seu prontuário apenas informações registradas sobre dados epidemiológicos, episódios semelhantes a AVC, crises convulsivas e os laudos do teste molecular e da eletroneuromiografia.

TABELA 4. Características demográficas e manifestações clínicas

FAMÍLIA	I	II	III	IV	V	VI	VII	IV	VI	VIII	II	IX
INDIVÍDUOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IDADE	33	30*	17*	55	40	11	10	58	41	39	61	47*
SEXO	M	M	M	M	M	F	M	M	F	F	F	F
HISTÓRIA FAMILIAR	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
DESENVOL. INICIAL NORMAL	+	-	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IDADE DE INÍCIO	3	0	ND	3	30	8	5	3	12	4	ND	3
EPISÓDIO SEMELHANTE A AVC	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
DIFICULDADE DE APRENDIZADO	-	-	ND	+	-	+	+	+	+	+	-	-
DEMÊNCIA	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
TRANSTORNO PSIQUIÁTRICO	+	+	ND	+	+	+	-	-	+	+	-	+
VÔMITO	+	+	ND	+	-	+	-	-	+	-	-	-
CEFALEIA	-	-	ND	-	+	+	+	+	+	+	-	-
CRISES EPILÉPTICAS	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
DOR MUSCULAR	+	-	ND	-	+	-	+	+	-	+	-	-
INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO	+	-	ND	-	+	-	+	+	-	+	-	-
CÂIMBRAS	-	-	ND	-	+	+	ND	ND	+	-	-	-
FADIGA	+	-	ND	+	+	-	+	ND	-	+	-	-
FRAQUEZA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
PTOSE PALPEBRAL	-	+	ND	-	-	-	-	-	-	+	-	+
OFTALMOPARESIA	+	-	ND	-	-	-	+	-	-	+	-	+
ATROFIA NERVO ÓPTICO	-	-	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RETINITE PIGMENTOSA	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CEGUEIRA CORTICAL	-	-	ND	-	+	+	+	-	-	-	-	-
SURDEZ NEUROSSENSORIAL	+	-	ND	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BAIXA ESTATURA	+	ND	ND	ND	+	+	-	ND	-	-	-	-
DIABETES	-	-	ND	-	-	-	ND	+	-	+	+	-
HIPOTIREOIDISMO	-	-	ND	ND	-	-	ND	+	+	-	ND	-
HIRSUTISMO	-	-	ND	ND	-	+	-	ND	-	-	-	-
MIOCLONIAS	+	-	ND	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ATAXIA	+	-	ND	+	+	+	+	-	-	+	-	-
SÍNCOPE/HIPOTENS. POSTURAL	+	-	ND	ND	+	+	ND	-	-	-	-	-
DISMOTILIDADE INTESTINAL	-	-	ND	-	-	+	-	-	+	+	-	+
NEFROPATIA	-	+	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	-
NEUROPATIA PERIFÉRICA	+	+	+	-	+	-	ND	-	-	-	-	-
ECO ALTERADO	-	ND	-	ND	-	-	-	ND	ND	-	ND	-
ECG ALTERADO	+	ND	-	+	-	+	-	+	-	+	ND	+

ND: Não detectado. M; masculino. F: Feminino. +: presente. -: ausente. *: Idade do óbito.

Desenvolvimento normal antes do início dos sintomas foi evidenciado em 10 pacientes. Um paciente (paciente 2) apresentou atraso motor, vindo a iniciar deambulação aos 2,8 anos de idade. O início dos sintomas ocorreu ainda na primeira década de vida em 8 pacientes e em até 92% dos casos os sintomas se iniciaram antes dos 40 anos de idade. Oito (67%) indivíduos apresentaram história familiar matrilinear positiva para sintomas que podem sugerir insultos

mitocondriais em um ou mais sistemas ou tinham familiares com a mutação m.3243A>G detectada, ainda que oligossintomáticos. A Paciente 10 tem mutação *de novo* (apesar de a mutação não ter sido encontrada no sangue de sua genitora, a análise molecular não foi realizada no sedimento urinário nem no músculo, o que impede a exclusão da possibilidade de estado de portadora assintomática da mutação).

Vários pacientes apresentaram um amplo espectro de sintomas relacionados a múltiplos órgãos em diversos graus de intensidade. A Tabela 5 apresenta os sinais e sintomas classificados pela frequência de acometimento dos pacientes avaliados.

TABELA 5. Sinais e Sintomas mais frequentes

SINAIS E SINTOMAS	FREQUÊNCIA (%)
MIOPATIA	92%
NEUROCOMPORTAMENTAIS	92%
LACTATO AUMENTADO	83%
CRISES EPILÁPTICAS	67%
ENDOCRIONOPATIA	58%
CEFALEIA	50%
ATAXIA	50%
CARDÍACOS	50%
EPISÓDIOS SEMELHANTES A AVC	42%
VÔMITO	42%
CK AUMENTADA	42%
DISAUTONOMIA	42%
NEUROPATIA PERIFÉRICA	33%
MIOCLONIA	33%
SURDEZ NEUROSENSORIAL	25%
CEGUEIRA CORTICAL	25%
NEFROPATIA	17%
OCULARES	17%

A miopatia foi a manifestação mais comum nessa população. Onze (92%) pacientes apresentaram sinais de miopatia caracterizados por fraqueza muscular grau 4 ou menos (MRC) para flexão de quadril e/ou abdução de ombros. Outros sintomas de disfunção muscular também foram encontrados como dor muscular em 42%, fadiga muscular em 42%, intolerância ao exercício em 42%, e câimbras em 25% dos pacientes. Quatro pacientes apresentaram algum grau de oftalmoparesia, sendo que as Pacientes 10 e 12 apresentavam quadro clínico da síndrome de CPEO e 3 pacientes apresentavam ptose palpebral.

As alterações neurocomportamentais foram muito frequentes, apresentando-se em 11 (92%) dos pacientes avaliados. Sintomas psiquiátricos foram evidenciados em 8 (64%) pacientes,

entre os mais comuns estão a depressão, psicose (incluindo alucinações e delírios) e ansiedade. A Paciente 10 tem diagnóstico de transtorno de personalidade *borderline*, a Paciente 12 tinha diagnóstico de transtorno de ansiedade e o Paciente 5 fez uso abusivo de drogas lícitas e ilícitas (cigarro, álcool, cocaína, maconha e LSD) por muitos anos. Seis (50%) pacientes apresentavam dificuldade de aprendizado desde a infância e três (25%) pacientes desenvolveram demência.

Dos sintomas relacionados ao comprometimento do SNC, as crises epiléticas foram os mais encontrados nessa população. Oito (67%) pacientes apresentaram desde crise parciais autolimitadas, até quadros de status convulsivos com necessidade de internação hospitalar e uso de ventilação mecânica. O Paciente 1 apresentou, inclusive, um episódio de *status epilepticus* precipitado pelo uso de pequena quantidade de álcool. Outros sintomas de comprometimento de SNC evidenciados foram a ataxia cerebelar em 50%, cefaleia com características migranasas em 50%, mioclonias em 33% e cegueira de origem cortical em 25% dos pacientes.

O envolvimento cardíaco foi evidenciado em 6 (50%) pacientes. Foram mais frequentemente encontradas alterações discretas em exame de ECG, como alterações da repolarização ventricular. A Paciente 10 apresentou bloqueio atrioventricular de 1º grau e o Paciente 1 apresentou taquicardia sinusal em 62% do traçado no Holter de 24h. Não foram evidenciados sinais de cardiomiopatia nas pacientes que foram submetidos a avaliação com ECO.

Cinco (42%) pacientes queixavam-se de episódios recorrentes de vômitos. Cinco (42%) pacientes apresentavam sinais de disautonomia, sendo que, desses, 4 apresentavam síncope recorrentes e/ou sintomas sugestivos de hipotensão ortostática e 3 queixavam-se de sintomas gastrointestinais frequentes, como desconforto abdominal e constipação.

Sete (58%) pacientes dessa população apresentaram algum comprometimento endocrinológico, sendo que, desses, 3 têm diabetes mellitus, 3 apresentaram baixa estatura, 2 têm hipotireoidismo e 1 hirsutismo. Três (25%) dos pacientes apresentaram surdez neurosensorial e 2 (17%) apresentaram sinais de nefropatia evidenciada por proteinúria de 323,3mg/24h (Paciente 2) e 557,5mg/24h (Paciente 11). O Paciente 2 teve episódios de edema generalizado associados a proteinúria em níveis de síndrome nefrótica, tratados em outro serviço, com relato de melhora após introdução de CoQ10. A paciente 11 é genitora do paciente 2 e tem diabetes associado a sobrepeso.

Sinais de comprometimento ocular foram evidenciados em 2 (17%) pacientes, sendo que o Paciente 1 apresentou retinite pigmentosa e a Paciente 6 apresentou atrofia do nervo óptico.

Um dado inédito relacionado à mutação m3243A>G foi visto no Paciente 1. Através de análise do espermograma, evidenciou-se que o paciente apresenta azoospermia não obstrutiva.

Em nossa casuística, 25% dos pacientes foram a óbito. O paciente 2 tentou suicídio por degolamento e faleceu dias depois por sepse de foco pulmonar durante internação hospitalar em janeiro de 2016. O Paciente 3 veio a óbito após episódio de *status epilepticus* refratário em 2012. A Paciente 12 apresentava disfagia importante e era frequentemente internada devido complicações clínicas secundárias a desnutrição grave, vindo a falecer em uma dessas internações em 2009.

O fenótipo clássico de MELAS (envolvendo episódios semelhantes a AVC recorrentes) classificado pelos critérios diagnóstico de Hirano *et al.*⁷² foi identificado em 5 (42%) indivíduos, os quais apresentaram-se com maior gravidade do quadro neurológico. O fenótipo de CPEO foi identificado em dois pacientes (Pacientes 10 e 12) que, além das alterações oculares, evidenciaram também outros sinais clínicos como transtornos psiquiátricos, alterações cardiovasculares, disautonomia e endocrinopatia. Os Pacientes 2, 4 e 8 apresentaram manifestações clínicas variadas que não são consistentes com outra síndrome mitocondrial reconhecida.

A tabela 6 apresenta a comparação das manifestações clínicas entre os grupos de pacientes com a síndrome clássica de MELAS e de pacientes que não apresentaram lesões semelhantes a AVC. Comparando-se os dois grupos, sugere-se que os pacientes com a síndrome completa de MELAS apresentaram maior comprometimento do SNC devido a maior frequência de ataxia cerebelar, mioclonias, comprometimento ocular (retinopatia pigmentar e atrofia óptica) e cegueira cortical. Os demais achados não apresentaram diferença significativa, entretanto, nota-se uma tendência de maior ocorrência de crises epiléticas no grupo de pacientes com a síndrome clássica de MELAS.

TABELA 6. Características clínicas dos pacientes com MELAS e pacientes sem AVC

Manifestações Clínicas	AVC	N	Rank Médio	Qui-Quadrado	p	Dado Faltante
ÓBITO	-	7	6,71	0,105	0,756	0
	+	5	6,20			
DESENVOLVIMENTO INICIAL NORMAL	-	7	5,71	0,571	0,450	1
	+	4	6,50			
MIOPATIA	-	7	6,14	0,714	0,398	0
	+	5	7,00			
LACTATO AUMENTADO	-	7	5,79	1,571	0,210	0
	+	5	7,50			
ALTERAÇÕES NEUROCOMPORTAMENTAIS	-	7	6,14	0,714	0,398	0
	+	5	7,00			
CRISES EPILÉPTICAS	-	7	4,86	3,265	0,071	1
	+	4	8,00			
ENDOCRINOPATIAS	-	7	5,64	0,319	0,572	1
	+	4	6,63			
CEFALEIA	-	7	5,36	0,964	0,326	1
	+	4	7,13			
ATAXIA	-	7	4,57	4,762	0,029	1
	+	4	8,50			
COMPROMETIMENTO CARDÍACO	-	5	6,50	1,500	0,221	2
	+	5	4,50			
COMPROMETIMENTO OCULAR	-	7	5,00	3,889	0,049	1
	+	4	7,75			
VÔMITOS	-	7	5,86	0,048	0,827	1
	+	4	6,25			
CK AUMENTADA	-	7	6,57	0,009	0,925	0
	+	5	6,40			
DISAUTONOMIA	-	7	5,86	0,048	0,827	1
	+	4	6,25			
NEUROPATIA PERIFÉRICA	-	7	5,36	2,514	0,113	0
	+	5	8,10			
MIOCLONIA	-	7	4,00	10,000	0,002	1
	+	4	9,50			
SURDEZ NEUROSENSORIAL	-	7	5,29	1,488	0,223	1
	+	4	7,25			
CEGUEIRA CORTICAL	-	7	4,50	6,563	0,010	1
	+	4	8,63			
NEFROPATIA	-	7	6,57	1,270	0,260	1
	+	4	5,00			

+: Grupo de pacientes com síndrome clássica de MELAS.

-: grupo de pacientes que não apresentaram lesões semelhantes a AVC.

p: nível de significância.

Dado faltante: número de pacientes que não tinha registro da manifestação em prontuário

Os dados referentes ao exame eletroneuromiográfico e à mensuração sérica de lactato e CK estão sumarizados na Tabela 7.

TABELA 7. Características laboratoriais

Paciente	Lactato	CK	Eletroneuromiografia
1	+	+	Axonal
2	+	+	Misto
3	+	-	Desmielinizante
4	+	-	Normal
5	+	-	Axonal
6	+	-	Normal
7	+	+	Miopático
8	-	-	ND
9	-	-	ND
10	+	+	Miopático
11	+	-	ND
12	+	+	Miopático

ND: Não detectado. Axonal: neuropatia axonal; Desmielinizante: neuropatia desmielinizante; Misto: Axonal + Miopático

A dosagem sérica de lactato estava aumentada em 10 indivíduos, com dosagens que variaram de 3,8 mmol/L a 12,2 mmol/L (valor normal < 2mmol/L). A CK estava aumentada em 41,6% dos pacientes, com níveis séricos que variaram de 320 U/L a 3866 U/L (valor normal < 190 U/L)

Eletroneuromiografia foi realizada em nove pacientes. Desses, o Paciente 1 apresentou quadro de mononeuropatia múltipla axonal (com lesão do nervo peroneiro profundo esquerdo e do nervo sural direito); Paciente 2 apresentou padrão misto de polineuropatia axonal associado a miopatia; Paciente 5 apresentou polineuropatia sensitivo motora axonal; os Pacientes 7, 10 e 12 apresentaram padrão miopático e os Pacientes 4 e 6 apresentaram o exame normal. O Paciente 3 apresentou padrão de polineuropatia sensitivomotora desmielinizante.

Seis pacientes foram submetidos à biópsia muscular. Todos esses pacientes apresentaram, ao estudo histológico, atrofia muscular caracterizada por irregularidade do diâmetro das fibras musculares. Três (Pacientes 7, 10 e 12) apresentaram RRF identificada na coloração tricrômico de Gomori modificada e na reação da SDH (Figura 6). Essas fibras apresentavam normalidade da atividade da COX, exceto no estudo histológico da Paciente 12, que revelou fibras com redução da atividade dessa enzima. O Paciente 1 apresentou fibras com deficiência isolada da atividade da COX.

Os ensaios enzimáticos da cadeia respiratória foram realizados em três pacientes: o Paciente 1 apresentou deficiência do complexo I, o Paciente 7 apresentou deficiência dos

complexos I e IV e a Paciente 10 apresentou normalidade da atividade dos complexos mitocondriais estudados.

FIGURA 6. Biópsia Muscular do Paciente 6. À direita, reação da SDH com presença de RRF (fibras com coloração azul forte). À direita, reação da COX com atividade normal em todas as fibras.

Estudo de neuroimagem foi realizado em 10 pacientes, sendo que destes apenas 3 não tiveram estudo de metabólitos cerebrais através da RNMeS. Dos 12 pacientes incluídos no estudo, 2 não foram submetidos a exame de neuroimagem. A Paciente 9 não compareceu ao setor de Neuroimagem do nosso serviço devido a complicações clínicas de sua filha (Paciente 6), a qual estava internada em outro serviço. A Paciente 12 havia falecido em 2009 sem antes ter realizado estudo de imagem.

Cinco (46%) pacientes dessa população tiveram lesões semelhantes a AVC com as características da síndrome de MELAS: lesões multifocais envolvendo regiões corticais e subcorticais que não são limitadas a um território vascular e tendem a se estender progressivamente. Essas lesões acometeram principalmente os lobos occipitais, seguidos pelos parietais e temporais (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição por lobo encefálico das lesões semelhantes a AVC

Outras características evidenciadas foram as alterações nos núcleos da base (principalmente caracterizadas por hipossinal em imagens de T2 e FLAIR e hipersinal em T1) em 6 pacientes, sendo muito sutil nos Pacientes 2,4 e 5. Sinais de atrofia encefálica em graus variados em 6 pacientes e alterações da substância branca (hipersinal em T2 e FLAIR) em 10 pacientes, sendo esta sutil nos Pacientes 2, 4, 5 e 7. A Tabela 8 sumariza os achados de neuroimagem e as figuras 7 e 8 mostram alterações de neuroimagem de pacientes com MELAS e de pacientes que não apresentaram lesões semelhantes a AVC, respectivamente.

TABELA 8. Alterações encefálicas evidenciadas por Neuroimagem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LESÃO SEMELHANTE A AVC	+	-	+	-	+	+	+	-	ND	-	-	ND
NNBB	+	+	+	+	+	-	-	+	ND	-	-	ND
ATROFIA	+	+	+	+	-	+	-	-	ND	+	-	ND
SB	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	ND
PICO LACTATO	+	+	+	-	+	+	ND	ND	ND	ND	+	ND
REDUÇÃO DA NAA	+	-	+	+	-	+	ND	ND	ND	ND	-	ND

ND: Não detectado. +: presente. -: ausente. NNBB: Alteração de sinal em núcleos da base. SB: Alteração de sinal em substância branca

FIGURA 7. Neuroimagem de pacientes com MELAS. A: Paciente 3. B: Paciente 6.

FIGURA 8. Neuroimagem de pacientes sem lesões semelhantes a AVC. A: Paciente 4. B: paciente 11

O exame de RNMes (Figura 9) foi realizado em apenas sete pacientes. O estudo dos metabólitos encefálicos evidenciou pico de lactato anômalo em 6 pacientes. A redução do NAA foi evidenciada em 4 pacientes. A RNMes do Paciente 5 identificou níveis do NAA no limite inferior da normalidade.

FIGURA 9. Estudo de metabólitos encefálicos com RNMes do Paciente 3: Demonstrando pico anômalo de lactato (estrela) e redução do NAA (quadrado).

Comparando-se os resultados das alterações evidenciadas por estudos de Neuroimagem entre os pacientes com MELAS e os que não apresentaram lesões semelhantes a AVC (Tabela 9), identificamos que não há distinção entre os grupos quanto à presença de alteração de sinal nos núcleos da base, atrofia encefálica e alteração de sinal na substância branca. Já quanto ao estudo dos metabólitos encefálicos, os pacientes com MELAS, aparentemente, apresentaram com maior frequência picos anômalos de lactato; já que 100% deles apresentaram essa alteração em comparação aos demais pacientes, nos quais esse pico foi demonstrado em apenas 67%. O mesmo se deu com relação à redução do metabólito NAA, que foi mais frequente nos pacientes com MELAS do que nos demais (60% e 33%, respectivamente).

TABELA 9. Percentual de alterações encefálicas por grupo de pacientes (Lesão semelhante a AVC X Sem AVC)

	Lesão semelhante a AVC			Sem AVC		
	Frequência	% Válido	Dados Faltantes	Frequência	% Válido	Dados Faltantes
NNBB	3	60%	0	3	60%	2
ATROFIA	3	60%	0	3	60%	2
SB	5	100%	0	5	100%	2
PICO DE LACTATO	4	100%	1	2	67%	4
REDUÇÃO DO NAA	3	60%	1	1	33%	4

NNBB: Alteração de sinal em núcleos da base. SB: Alteração de sinal em substância branca. Dados faltantes: número de pacientes não submetidos à avaliação.

A Paciente 6 foi a única submetida a estudo com SPECT que evidenciou defeito perfusional acometendo os lobos parietal, temporal e occipital esquerdos, mais acentuadamente na região parieto-occipital e no cerebelo.

7. DISCUSSÃO

A síndrome MELAS é caracterizada pela apresentação clínica de miopatia, encefalopatia, acidose láctica e eventos semelhantes a AVC e é frequentemente associada a mutação m.3243A>G. Estudos populacionais recentes sugerem uma prevalência dessa mutação de 0,18 a 236/100.000 indivíduos, indicando que ela é ainda pouco reconhecida¹⁻³. Identificar qual paciente deve ser indicado para rastreio dessa mutação é desafiador, já que ela não é específica

para a síndrome completa da MELAS e tem sido associada a um amplo espectro de manifestações clínicas em diferentes graus de intensidade de acometimento.

Com o objetivo de catalogar informações a respeito dos vários fenótipos associados a essa alteração genética mitocondrial, nós estudamos, retrospectivamente, 12 indivíduos de 9 famílias com a mutação m.3243A>G em seguimento no ANEM/HCFMRP-USP. Esta é a maior série de casos de indivíduos com a mutação m.3243A>G do Brasil, até o momento.

Tipicamente, os indivíduos que apresentam essa mutação começam a manifestar sinais e sintomas ainda na infância. De acordo com trabalhos de revisão, 65% a 75% dos afetados começam a ter alterações clínicas até os 20 anos de idade, sendo que 90% dos casos são clinicamente manifestos até os 40 anos de idade; apenas 5% a 8% apresentam antes dos dois anos de idade e 1% a 6% após os 40 anos^{72,82}. Esses estudos corroboram os achados em nossa amostra, em que 92% dos pacientes tiveram início de suas manifestações clínicas antes dos 40 anos de idade, e 83% apresentaram desenvolvimento neuropsicomotor normal na infância antes do início dos sintomas.

A suspeita de uma doença mitocondrial é um desafio diagnóstico complexo devido à grande heterogeneidade clínica e genética desse grupo de doenças. Níveis diversos de heteroplasmia da mutação m.3243A>G podem provocar desde a síndrome clássica de MELAS até quadros muito sutis como migrânea, intolerância ao exercício e sintomas depressivos leves em indivíduos de uma mesma família²⁰. Desse modo, a história familiar matrilinear deve ser detalhadamente revista, já que outros parentes podem apresentar a mutação, o que implica cuidados de saúde para reconhecimento e tratamento precoce de problemas com potencial de gerar sequelas. Em nosso estudo, oito indivíduos apresentaram história familiar matrilinear positiva para sintomas que podem sugerir insultos mitocondriais em um ou mais sistemas ou tinham familiares com a mutação m.3243A>G detectada, ainda que oligossintomáticos. Os Pacientes 4 e 8 são irmãos. Os Pacientes 2 e 6 são filhos das Pacientes 11 e 9, respectivamente. O Paciente 3, falecido aos 17 anos, teve irmão com quadro semelhante que também havia falecido e a pesquisa da mutação foi positiva em sua mãe. Além disso, o Paciente 2 tem primo da família materna com história de crise epilépticas. A mãe do Paciente 5 tem história de migrânea. A mãe da Paciente 10 teve análise molecular negativa para a mutação m.3243A>G.

Os critérios diagnósticos definem que os pacientes com de síndrome de MELAS devem apresentar sinais de comprometimento focal do SNC, caracterizado, principalmente, por eventos semelhantes a AVC⁷². A maioria desses pacientes apresenta também uma grande diversidade de sintomas neurológicos e psiquiátricos, envolvendo crises convulsivas, cefaleia, distúrbios

cognitivos e diversos transtornos psiquiátricos. Entretanto, diversos estudos recentes reafirmam a importância de se reconhecer que não só os pacientes com MELAS, como também parentes desses pacientes que são portadores da mutação m.3243A>G, apresentam uma grande prevalência de sinais e sintomas relacionados a disfunção mitocondrial, como a intolerância ao exercício, endocrinopatias, migrânea, desordens gastrointestinais, transtornos neurocomportamentais, surdez neurossensorial, crises epiléticas e história de dificuldade de aprendizado na escola^{2,49,62,71,80,123,124}. Em nosso estudo, identificamos que os pacientes apresentaram um amplo espectro de manifestações clínicas relacionadas a disfunção mitocondrial em múltiplos órgãos e sistemas, em diversos graus de intensidade. Houve uma frequência de 42% (pacientes 1, 3, 5, 6 e 7) do fenótipo clássico de MELAS. Em geral, esses pacientes apresentavam-se com maior comprometimento do SNC, sendo mais frequentemente acometidos por ataxia cerebelar, mioclonias, cegueira cortical e comprometimento ocular (retinite pigmentosa e atrofia de nervo óptico), além de parecer haver uma maior tendência a terem crises epiléticas. A Paciente 10 apresentou o fenótipo da síndrome de CPEO associado a diabetes mitocondrial e a distúrbio de condução cardíaca. A Paciente 12 apresentou o fenótipo da síndrome de CPEO associado a transtorno psiquiátrico e distúrbio de condução cardíaca. Os demais pacientes (42%) apresentaram características clínicas que não configuravam uma síndrome clínica definida.

As manifestações de miopatia foram as mais frequentes nessa população, de modo que 92% apresentaram fraqueza muscular de predomínio proximal. Outros sinais como dor muscular, fadiga, intolerância ao exercício, oftalmoparesia, ptose palpebral e câimbras também foram muito frequentes. Esses achados são consistentes com os dados da literatura internacional que indicam uma prevalência de intolerância ao exercício de 73% a 100% e de fraqueza muscular de 42% a 89% dos indivíduos com MELAS⁸².

Dentre as alterações neurocomportamentais, os transtornos psiquiátricos foram os mais frequentes, com 67% dos pacientes apresentando ao menos algum sintoma que variaram entre sintomas depressivos e ansiosos, surtos psicóticos e transtornos da personalidade do cluster B. Metade dos indivíduos possuíam história de dificuldade de aprendizado na escola e 25% dos pacientes desenvolveram quadro demencial. Esses dados coincidem com os estudos que revelam uma alta prevalência de aproximadamente 50% de transtornos psiquiátricos em pacientes com doenças mitocondriais⁸². Entretanto, o número de pacientes com diagnóstico de demência em nosso estudo foi muito inferior ao detectado em outros estudos com pacientes com MELAS, que indicam uma prevalência de 40% a 90%⁸². Essa diferença pode decorrer do fato de que existem

poucos estudos realizados com pacientes portadores da mutação m.3243A>G que não possuem a síndrome clássica de MELAS, e desse modo, com menor comprometimento do SNC. Kaufmann *et al.* descreveram que pacientes com MELAS têm menores escores ao serem submetidos a testes cognitivos do que seus parentes de primeiro grau portadores da mutação; mas a prevalência de transtornos psiquiátricos era alta nos dois grupos⁸⁰.

Estudos indicam que a prevalência de crises epiléticas em pacientes com MELAS varia de 71% a 96% dos indivíduos⁸². Em nossa série, epilepsia foi um achado frequente, com 67% dos indivíduos apresentando desde crise focais simples de curta duração, até quadros de status convulsivo de difícil controle. Além disso, outros sinais de comprometimento do SNC foram muito frequentes em nossa casuística, como migrânea (50%), ataxia cerebelar (50%) e surdez neurossensorial (25%), que apresentaram frequências semelhantes às encontradas em outros estudos⁸².

Alterações cardíacas são muito frequentes em pacientes com doença mitocondrial relacionada à mutação m.3243A>G, de modo que 20% a 50% dos indivíduos apresentam algum sinal de disfunção cardíaca (em especial a cardiomiopatia com HVE e distúrbios de condução cardíaca) que são preditores independentes de morbidade e mortalidade precoce nesses pacientes^{105,107-109}. Em nossa série, foi encontrada uma frequência de 50% dos indivíduos com alterações discretas no ECG, caracterizadas principalmente por alteração da repolarização ventricular, taquicardia sinusal e bloqueio atrioventricular de 1º grau. Os fenótipos de síndrome de WPW e a HVE não foram detectadas, apesar de serem os mais frequentemente relacionados à mutação m.3243A>G⁸².

Neuropatia periférica é um achado relativamente comum em pacientes com a mutação m.3243A>G e frequentemente apresenta padrão axonal. Os casos descritos com neuropatia desmielinizante são muito raros. Kaufmann *et al.*, em um estudo com 30 indivíduos com a mutação, identificaram uma prevalência de 77% dos pacientes com neuropatia periférica, que em sua maioria apresentava padrão de comprometimento axonal⁸¹. Em nosso estudo, encontramos uma frequência de 33% de neuropatias periféricas. A maioria dos pacientes apresentou padrão de comprometimento axonal. Apenas um paciente teve padrão de neuropatia desmielinizante. Como nem todos os pacientes incluídos nesta série foram submetidos a exame eletroneuromiográfico, não se pode determinar que a incidência de neuropatias periféricas é menor nessa população. Entretanto, nenhum dos pacientes que não foram submetidos a esse exame apresentavam sinais clínicos de neuropatia periférica de fibras grossas.

Estudos recentes revelaram que 80% dos pacientes com MELAS e mais de 60% dos portadores da mutação m.3243A>G apresentam um ou mais sintomas de disautonomia⁸⁷. Neste estudo, evidenciamos uma frequência menor (42%) desses sintomas na população estudada. Dentre os sintomas identificados, os mais frequentes foram sintomas gastrointestinais de desconforto abdominal e constipação, com frequência de 33%, e síncope, tonturas e sintomas sugestivos de hipotensão ortostática, com frequência de 25%.

As endocrinopatias são comumente encontradas em pacientes com disfunção mitocondrial. Diabetes mellitus acomete cerca de 30% (em geral, começa na terceira ou quarta década de vida e não está associada a obesidade) e baixa estatura é relatada em 33% a 82% dos indivíduos com MELAS, além de hipotireoidismo e hirsutismo, que também são relatados^{82,144}. Identificamos em nossa série uma frequência de 25% de diabetes, 25% de pacientes com baixa estatura, 17% de hipotireoidismo e 1 paciente com hirsutismo. A Paciente 11 tem um quadro de doença mitocondrial oligossintomática, apresentando diabetes mellitus associado ao aumento de lactato sérico. Entretanto, a paciente também apresenta obesidade, fato que não é comum nos pacientes com a mutação m.3243A>G.

Comprometimento ocular teve frequência de 17% nessa série, e os achados foram retinite pigmentosa e atrofia do nervo óptico. Esse dado é corroborado por estudos que revelam que menos de 25% dos pacientes com a mutação m.3243A>G apresentam esses achados⁸².

Na literatura, a mioclonia é o distúrbio do movimento mais comumente relatado em pacientes com MELAS, com prevalência que varia de 10% a 30% dos casos⁹⁰. Nós encontramos uma frequência de 33% dos indivíduos com mioclonias. Não detectamos outros distúrbios do movimento nessa população.

Um dos pacientes avaliados neste estudo (Paciente 1) apresentou também quadro de *status epilepticus* precipitado por consumo de pequena dose de álcool. Recentemente, foi relatado um caso de morte súbita de paciente com a mutação m.3243A>G que havia ingerido pequena quantidade de álcool no dia do óbito¹⁰⁵. Esses casos indicam uma possível hipersensibilidade desses pacientes ao álcool, de modo que os pacientes portadores dessa mutação devem ser alertados quanto a esse risco. Esse fato pode decorrer da deficiência de produção de ATP pela cadeia respiratória associada ao efeito inibitório do álcool na gluconeogênese¹⁰⁶.

Outro aspecto peculiar desse paciente é o achado de azoospermia. Disfunções mitocondriais podem ter um papel fundamental na infertilidade masculina. Estudos revelam que a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial e acúmulo de radicais livres afetam negativamente a concentração dos espermatozoides (devido à apoptose e parada da

espermatogênese), a morfologia e, principalmente, a mobilidade dessas células¹¹⁷⁻¹²². Até o momento não há relatos na literatura de azoospermia não obstrutiva relacionada às doenças mitocondriais.

Em nossa casuística, identificamos uma prevalência de três óbitos que foram secundários a: *status epilepticus* (Paciente 3), sepse de foco pulmonar após tentativa de suicídio (Paciente 2) e complicações clínicas secundárias a desnutrição grave (Paciente 12). As causas mais comuns de morte entre os pacientes com MELAS incluem eventos cardíacos, *status epilepticus*, eventos semelhantes a AVC, pneumonia aspirativa ou sepse, íleo paralítico e acidose metabólica¹⁰⁵. Ng *et al.* alertam também quanto à observação de mortes súbitas, em geral consequentes a arritmias cardíacas, que podem ocorrer em indivíduos portadores da mutação m.3243A>G oligossintomáticos ou até mesmo assintomáticos¹⁰⁵.

Exames de neuroimagem são úteis para o suporte diagnóstico de MELAS, ainda que não apresentem alta especificidade ou sensibilidade para doenças mitocondriais. A manifestação clínica mais característica da síndrome de MELAS são os eventos semelhantes a AVC, que cursam com lesões multifocais semelhantes a infartos, com envolvimento cortical e subcortical que podem simular uma lesão isquêmica. Entretanto, essas lesões, que não seguem um território vascular, tendem a se espalhar progressiva e lentamente durante um mesmo episódio e recorrem em diferentes áreas do encéfalo, sendo mais frequentes nas regiões posteriores do encéfalo¹³⁴. É descrita também a presença de alteração de sinal na substância cinzenta profunda (núcleos da base cerebral) em 50% daqueles com a síndrome completa e em 71% daqueles com a síndrome incompleta de MELAS¹³⁹. Além disso, também há descrição de alteração de sinal na substância branca, mais prevalentes nos indivíduos com MELAS completa; e atrofia encefálica, com predomínio cerebelar, em 91% dos indivíduos com a mutação m.3243A>G¹³⁹.

Em nossa série de casos, duas pacientes (Pacientes 9 e 12) não foram submetidas a estudo de neuroimagem. Identificamos que 42% dos pacientes apresentaram lesões semelhantes a AVC reveladas por estudos de neuroimagem. Essas lesões acometeram lobos parietais, temporais e, especialmente, os lobos occipitais. Não identificamos diferença de prevalência de atrofia, alterações de sinal em núcleos da base e de substância branca entre os pacientes com MELAS e os pacientes que não tiveram lesões semelhantes a AVC. As pacientes que não foram submetidas a avaliação de neuroimagem não apresentaram clínica sugestiva de lesões semelhantes a AVC. Esse viés de informação pode ter papel importante no achado de que não há diferença entre os grupos estudados quanto aos achados de atrofia, alterações de sinal em núcleos da base e de substância branca.

Os achados característicos de MELAS na RNMe são a redução do NAA e o surgimento de pico anômalo de lactato, que refletem o metabolismo anaeróbico e são encontrados mesmo em regiões cerebrais sem lesões evidentes¹³⁶. Nesse estudo, todos os pacientes que apresentaram lesões semelhantes a AVC apresentaram pico anômalo de lactato à RNMe e em 60% deles foi evidenciada a redução do NAA. Apenas 3 pacientes que não apresentaram lesões semelhantes a AVC foram submetidos a estudo de metabólitos cerebrais com RNMe, sendo que 2 deles apresentaram discreto aumento de lactato e apenas um teve discreta redução do NAA. Estudos recentes destacaram que os paciente com a síndrome incompleta de MELAS paradoxalmente podem apresentar níveis normais ou até aumentado na NAA na substância cinzenta profunda¹³⁷. Tal fato pode ser consequência de um mecanismo compensatório da disfunção energética que leva à proliferação mitocondrial neuronal.

Imagens de SPECT revelam hiperperusão até aproximadamente 1 mês do início do evento semelhante a AVC e hipoperusão na fase crônica¹³⁶. Apenas uma paciente foi avaliada com SPECT que revelou hipoperusão na região parieto-occipital e no cerebelo.

A síndrome de MELAS e seu espectro clínico são doenças extremamente raras. Nossa casuística apresenta um pequeno número de pacientes, entretanto, apresentamos nesse trabalho a maior série de casos de pacientes com manifestações clínicas relacionadas à mutação m.3243A>G do Brasil.

8. CONCLUSÃO

Doença mitocondrial decorrente da mutação m.3243A>G é de ocorrência rara no contexto das disfunções neurológicas. No LNAE a taxa de detecção foi 1,96% num período de 15 anos. O amplo espectro de apresentação clínica é uma característica notável entre os pacientes com a mutação m.3243A>G, o que leva à necessidade de avaliação da mutação em pacientes com quadros clínicos distintos e uma baixa taxa de detecção da mesma.

Nós identificamos o achado inédito de azoospermia associada a mutação m.3243A>G. Esse dado corrobora com o conceito vigente de realizar uma investigação abrangente que permita a identificação de novas características da doença, como é o caso da azoospermia que ainda havia sido descrita na literatura como associada a m.3243A>G.

Identificamos que apenas 42% dos pacientes foram classificados com a forma clássica de MELAS, 17% apresentaram CPEO associada a outros sintomas como transtornos psiquiátricos e diabetes mellitus. Os demais pacientes apresentavam características clínicas que não configuravam uma síndrome clínica definida. Nossos achados confirmam que a disfunção mitocondrial secundária à mutação m.3243A>G é responsável por uma pleora de apresentação de sinais e sintomas multissistêmicos, de modo que é possível determinar um amplo espectro clínico relacionado à mutação mais frequente da síndrome de MELAS. O reconhecimento de que os portadores da mutação m.3243A>G inseridos no espectro clínico de MELAS estão sob risco de desenvolverem problemas de saúde graves, como cardiopatia, leva ao aperfeiçoamento das estratégias diagnósticas, preventivas e terapêuticas a serem utilizadas no cuidado desses pacientes.

Identificamos uma maior incidência de manifestações clínicas associadas a comprometimento do SNC nos pacientes com a síndrome clássica de MELAS. Esses pacientes apresentaram significativamente maior incidência de ataxia cerebelar, mioclonias, cegueira cortical e comprometimento ocular, caracterizado por retinite pigmentosa e atrofia óptica. Além disso, sugere-se uma tendência maior a apresentarem crises epiléticas.

A ocorrência de lesões encefálicas evidenciadas por RNM é frequente nos pacientes com a mutação m.3243A>G, as quais envolvem alteração dos sinais dos núcleos da base e da substância branca e atrofia encefálica, independentemente da síndrome clínica apresentada. Nos pacientes com a síndrome de MELAS, a distribuição das lesões semelhantes a AVC corrobora estudos prévios que indicam envolvimento predominantemente occipital. Além disso, houve achado de alteração marcada de metabólitos encefálicos avaliados por RNMs, como pico anômalo de lactato e redução do NAA, marcadamente nos pacientes com a síndrome clássica de MELAS.

9. REFERÊNCIAS

1. de Laat, P. *et al.* Inheritance of the m.3243A>G mutation. *JIMD Rep.* **8**, 47–50 (2013).
2. Yatsuga, S. *et al.* MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 619–24 (2012).
3. Manwaring, N. *et al.* Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion* **7**, 230–3 (2007).

4. Ruiz-Pesini, E. *et al.* An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* **35**, D823–8 (2007).
5. Osellame, L. D., Blacker, T. S. & Duchon, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 711–23 (2012).
6. Emelyanov, V. V. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1599–618 (2003).
7. Friedman, J. R. & Nunnari, J. Mitochondrial form and function. *Nature* **505**, 335–343 (2014).
8. NELSON, D. L. & COX, M. . *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. (Artmed, 2014).
9. Mishra, P. & Chan, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 634–646 (2014).
10. Birky, C. W. The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 125–148 (2001).
11. Chandel, N. S. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol.* **12**, 34 (2014).
12. Kamer, K. J. & Mootha, V. K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 545–53 (2015).
13. Alam, M. R. *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ Uptake 1 (MICU1) and Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter (MCU) Contribute to Metabolism-Secretion Coupling in Clonal Pancreatic β -Cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 34445–34454 (2012).
14. Tarasov, A. I. *et al.* Frequency-dependent mitochondrial Ca(2+) accumulation regulates ATP synthesis in pancreatic β cells. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **465**, 543–54 (2013).
15. Picard, M. *et al.* Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E4033–42 (2014).
16. Picard, M. Mitochondrial synapses: intracellular communication and signal integration. *Trends Neurosci.* **38**, 468–74 (2015).
17. Miller, F. J., Rosenfeldt, F. L., Zhang, C., Linnane, A. W. & Nagley, P. Precise determination of mitochondrial DNA copy number in human skeletal and cardiac muscle by a PCR-based assay: lack of change of copy number with age. *Nucleic Acids Res.* **31**, e61 (2003).
18. Taanman, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 103–23 (1999).
19. Interna, M. PAULO JOSÉ LORENZONI MELAS : ESTUDO CLÍNICO , BIOQUÍMICO , ELETROFISIOLÓGICO , MORFOLÓGICO E MOLECULAR. (2008).
20. DiMauro, S., Schon, E. a, Carelli, V. & Hirano, M. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 429–444 (2013).
21. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–65 (1981).
22. Crick, F. H. Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* **19**, 548–55 (1966).
23. Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. & Wallace, D. C. Maternal inheritance of human

- mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6715–9 (1980).
24. Schwartz, M. & Vissing, J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* **347**, 576–80 (2002).
 25. St John, J. *et al.* Failure of elimination of paternal mitochondrial DNA in abnormal embryos. *Lancet (London, England)* **355**, 200 (2000).
 26. Houshmand, M., Holme, E., Hanson, C., Wennerholm, U. B. & Hamberger, L. Is paternal mitochondrial DNA transferred to the offspring following intracytoplasmic sperm injection? *J. Assist. Reprod. Genet.* **14**, 223–7 (1997).
 27. Sutovsky, P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microsc. Res. Tech.* **61**, 88–102 (2003).
 28. Davis, R. L. & Sue, C. M. The genetics of mitochondrial disease. *Semin. Neurol.* **31**, 519–30 (2011).
 29. DiMauro, S. Mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 80–8 (2004).
 30. Rossignol, R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* **370**, 751–62 (2003).
 31. Thorburn, D. R. Mitochondrial disorders: Prevalence, myths and advances. *J. Inherit. Metab. Dis.* **27**, 349–362 (2004).
 32. LUFT, R., IKKOS, D., PALMIERI, G., ERNSTER, L. & AFZELIUS, B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J. Clin. Invest.* **41**, 1776–804 (1962).
 33. ENGEL, W. K. & CUNNINGHAM, G. G. RAPID EXAMINATION OF MUSCLE TISSUE. AN IMPROVED TRICHOME METHOD FOR FRESH-FROZEN BIOPSY SECTIONS. *Neurology* **13**, 919–23 (1963).
 34. DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Nakagawa, M. & DeVivo, D. C. Mitochondrial myopathies. *Ann. Neurol.* **17**, 521–38 (1985).
 35. Shapira, Y., Harel, S. & Russell, A. Mitochondrial encephalomyopathies: a group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. *Isr. J. Med. Sci.* **13**, 161–4 (1977).
 36. Wallace, D. C. *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**, 1427–1430 (1988).
 37. Holt, I. J., Harding, A. E. & Morgan-Hughes, J. A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**, 717–719 (1988).
 38. Chinnery, P. F. & Hudson, G. Mitochondrial genetics. *Br. Med. Bull.* **106**, 135–59 (2013).
 39. Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. a, Relton, C. L. & Chinnery, P. F. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 254–260 (2008).
 40. Schaefer, A. M. *et al.* Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann. Neurol.* **63**, 35–9 (2008).
 41. Darin, N., Oldfors, A., Moslemi, A. R., Holme, E. & Tulinius, M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological,

- biochemical, and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* **49**, 377–83 (2001).
42. Skladal, D., Halliday, J. & Thorburn, D. R. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* **126**, 1905–12 (2003).
 43. Thorburn, D. R. *et al.* Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1659**, 121–8 (2004).
 44. Haas, R. H. *et al.* The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* **94**, 16–37 (2008).
 45. Mattman, A. *et al.* Diagnosis and management of patients with mitochondrial. *BC Med. J.* **53**, 177–182 (2011).
 46. Danhauser, K. *et al.* Treatment options for lactic acidosis and metabolic crisis in children with mitochondrial disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **38**, 467–75 (2015).
 47. Friedman, S. D., Shaw, D. W. W., Ishak, G., Gropman, A. L. & Saneto, R. P. The use of neuroimaging in the diagnosis of mitochondrial disease. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **16**, 129–35 (2010).
 48. Sue, C. M. *et al.* Detection of MELAS A3243G point mutation in muscle, blood and hair follicles. *J. Neurol. Sci.* **161**, 36–9 (1998).
 49. de Laat, P. *et al.* Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **35**, 1059–69 (2012).
 50. O’Callaghan, M. M. *et al.* Mutation loads in different tissues from six pathogenic mtDNA point mutations. *Mitochondrion* **22**, 17–22 (2015).
 51. Karpati, G., Hilton-Jones, D., Bushby, K. & Griggs, R. C. *Disorders of Voluntary Muscle*. (2010).
 52. Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviati, L. & Angelini, C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7**, 1235–46 (2012).
 53. Goto, Y., Nonaka, I. & Horai, S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **348**, 651–653 (1990).
 54. Kobayashi, Y. *et al.* A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 816–22 (1990).
 55. Kirino, Y., Goto, Y.-I., Campos, Y., Arenas, J. & Suzuki, T. Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7127–32 (2005).
 56. Kirino, Y. *et al.* Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15070–5 (2004).
 57. Goto, Y., Nonaka, I. & Horai, S. A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim. Biophys. Acta* **1097**, 238–40 (1991).
 58. DiMauro, S. & Hirano, M. MELAS - GeneReviews®. *NCBI Bookshelf* 1–18 at

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1233/>>

59. Koga, Y. *et al.* Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 608–14 (2012).
60. Cohen, B. H. Neuromuscular and systemic presentations in adults: diagnoses beyond MERRF and MELAS. *Neurotherapeutics* **10**, 227–42 (2013).
61. Koga, Y., Akita, Y., Takane, N., Sato, Y. & Kato, H. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Arch. Dis. Child.* **82**, 407–11 (2000).
62. Nesbitt, V. *et al.* The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation--implications for diagnosis and management. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 936–8 (2013).
63. Shapira, Y., Cederbaum, S. D., Cancilla, P. A., Nielsen, D. & Lippe, B. M. Familial poliodystrophy, mitochondrial myopathy, and lactate acidemia. *Neurology* **25**, 614–21 (1975).
64. Pavlakis, S. G., Phillips, P. C., DiMauro, S., De Vivo, D. C. & Rowland, L. P. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.* **16**, 481–8 (1984).
65. Kobayashi, M. *et al.* Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome and NADH-CoQ reductase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **9**, 301–4 (1986).
66. Kobayashi, M. *et al.* Two cases of NADH-coenzyme Q reductase deficiency: relationship to MELAS syndrome. *J. Pediatr.* **110**, 223–7 (1987).
67. Goda, S. *et al.* Clinical improvement after administration of coenzyme Q10 in a patient with mitochondrial encephalomyopathy. *J. Neurol.* **234**, 62–3 (1987).
68. Werneck, L. C., Abdalla, H. & Lohr, A. MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes): report of a case. *Arq. Neuropsiquiatr.* **45**, 288–94 (1987).
69. Marie, S. K. *et al.* A Caucasian family with the 3271 mutation in mitochondrial DNA. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **52**, 136–9 (1994).
70. Conforto, A. B. *et al.* Screening for MELAS mutations in young patients with stroke of undetermined origin. *Arq. Neuropsiquiatr.* **65**, 371–6 (2007).
71. Lorenzoni, P. J. *et al.* MELAS: clinical features, muscle biopsy and molecular genetics. *Arq. Neuropsiquiatr.* **67**, 668–76 (2009).
72. Hirano, M. *et al.* Melas: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul. Disord.* **2**, 125–35 (1992).
73. Minamoto, H. *et al.* Mitochondrial encephalomyopathy with elderly onset of stroke-like episodes. *Intern. Med.* **35**, 991–5 (1996).
74. Kaufman, K. R., Zuber, N., Rueda-Lara, M. A. & Tobia, A. MELAS with recurrent complex partial seizures, nonconvulsive status epilepticus, psychosis, and behavioral disturbances: Case analysis with literature review. *Epilepsy Behav.* **18**, 494–497 (2010).
75. Finsterer, J. Cognitive decline as a manifestation of mitochondrial disorders

- (mitochondrial dementia). *J. Neurol. Sci.* **272**, 20–33 (2008).
76. Galna, B. *et al.* Discrete gait characteristics are associated with m.3243A>G and m.8344A>G variants of mitochondrial disease and its pathological consequences. *J. Neurol.* **261**, 73–82 (2014).
 77. Kaufmann, P. *et al.* Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype. *Neurology* **77**, 1965–71 (2011).
 78. Scarpelli, M. *et al.* Mitochondrial Sensorineural Hearing Loss: A Retrospective Study and a Description of Cochlear Implantation in a MELAS Patient. *Genet. Res. Int.* **2012**, 287432 (2012).
 79. Anglin, R. E., Garside, S. L., Tarnopolsky, M. A., Mazurek, M. F. & Rosebush, P. I. The psychiatric manifestations of mitochondrial disorders: a case and review of the literature. *J. Clin. Psychiatry* **73**, 506–12 (2012).
 80. Kaufmann, P. *et al.* Protean phenotypic features of the A3243G mitochondrial DNA mutation. *Arch. Neurol.* **66**, 85–91 (2009).
 81. Kaufmann, P. *et al.* Nerve conduction abnormalities in patients with MELAS and the A3243G mutation. *Arch. Neurol.* **63**, 746–8 (2006).
 82. El-Hattab, A. W., Adesina, A. M., Jones, J. & Scaglia, F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol. Genet. Metab.* **116**, 4–12 (2015).
 83. Scaglia, F., Millan, R. D., Brown, C. W. & Wong, L.-J. C. Bipolar disorder as presenting clinical feature associated with the 3243 A>G mutation in the mitochondrial tRNA Leu(UUR) gene. *Mitochondrion* **10**, 232–233 (2010).
 84. Finsterer, J. MELAS in the heart. *Int. J. Cardiol.* **137**, e65–6 (2009).
 85. Malfatti, E. *et al.* High risk of severe cardiac adverse events in patients with mitochondrial m.3243A>G mutation. *Neurology* **80**, 100–5 (2013).
 86. Wortmann, S. B. *et al.* Mitochondrial DNA m.3242G > A mutation, an under diagnosed cause of hypertrophic cardiomyopathy and renal tubular dysfunction? *Eur. J. Med. Genet.* **55**, 552–6 (2012).
 87. Parsons, T. *et al.* Autonomic symptoms in carriers of the m.3243A>G mitochondrial DNA mutation. *Arch. Neurol.* **67**, 976–9 (2010).
 88. Piccoli, G. B. *et al.* Chronic kidney disease, severe arterial and arteriolar sclerosis and kidney neoplasia: on the spectrum of kidney involvement in MELAS syndrome. *BMC Nephrol.* **13**, 9 (2012).
 89. Seidowsky, A. *et al.* Renal involvement in MELAS syndrome - a series of 5 cases and review of the literature. *Clin. Nephrol.* **80**, 456–63 (2013).
 90. Singmaneesakulchai, S., Limotai, N., Jagota, P. & Bhidayasiri, R. Expanding spectrum of abnormal movements in MELAS syndrome (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes). *Mov. Disord.* **27**, 1495–7 (2012).
 91. Latkany, P., Ciulla, T. A., Cacchillo, P. F. & Malkoff, M. D. Mitochondrial maculopathy: geographic atrophy of the macula in the MELAS associated A to G 3243 mitochondrial DNA point mutation. *Am. J. Ophthalmol.* **128**, 112–4 (1999).

92. Pihlajaniemi, T. L., Pirttiniemi, P., Uusimaa, J. & Majamaa, K. Craniofacial morphology in children of mothers with the m.3243A>G mutation in mitochondrial DNA. *Cleft Palate. Craniofac. J.* **47**, 234–40 (2010).
93. Amornvit, J., Pasutharnchat, N., Pachinburavan, M., Jongpiputvanich, S. & Joyjinda, Y. Fulminant respiratory muscle paralysis, an expanding clinical spectrum of mitochondrial A3243G tRNA^{Leu} mutation. *J. Med. Assoc. Thai.* **97**, 467–72 (2014).
94. Blum, S., Robertson, T., Klingberg, S., Henderson, R. D. & McCombe, P. Atypical clinical presentations of the A3243G mutation, usually associated with MELAS. *Intern. Med. J.* **41**, 199–202 (2011).
95. Brackmann, F., Abicht, A., Ahting, U., Schröder, R. & Trollmann, R. Classical MERRF phenotype associated with mitochondrial tRNA(Leu) (m.3243A>G) mutation. *Eur. J. Pediatr.* **171**, 859–62 (2012).
96. Martikainen, M. H., Rönnemaa, T. & Majamaa, K. Prevalence of mitochondrial diabetes in southwestern Finland: a molecular epidemiological study. *Acta Diabetol.* **50**, 737–41 (2013).
97. Hirano, M. & Pavlakis, S. G. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): current concepts. *J. Child Neurol.* **9**, 4–13 (1994).
98. Naing, A. *et al.* Maternally inherited diabetes and deafness (MIDD): diagnosis and management. *J. Diabetes Complications* **28**, 542–6 (2014).
99. Gooriah, R., Dafalla, B. E. a & Venugopalan, T. C. Led astray: MELAS initially misdiagnosed as herpes simplex encephalitis. *Acta Neurol. Belg.* **115**, 789–92 (2015).
100. Sharfstein, S. R., Gordon, M. F., Libman, R. B. & Malkin, E. S. Adult-onset MELAS presenting as herpes encephalitis. *Arch. Neurol.* **56**, 241–3 (1999).
101. Hsu, Y.-C. *et al.* Adult-onset of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) syndrome presenting as acute meningoencephalitis: a case report. *J. Emerg. Med.* **43**, e163–6 (2012).
102. Isozumi, K. *et al.* A MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) mtDNA mutation that induces subacute dementia which mimicks Creutzfeldt-Jakob disease. *Intern. Med.* **33**, 543–6 (1994).
103. de Toledo, M. *et al.* MELAS syndrome masquerading as herpes encephalitis: genetic diagnosis. *Rev. Neurol.* **33**, 148–50
104. Johns, D. R., Stein, A. G. & Wityk, R. MELAS syndrome masquerading as herpes simplex encephalitis. *Neurology* **43**, 2471–3 (1993).
105. Ng, Y. S. *et al.* Sudden adult death syndrome in m.3243A>G-related mitochondrial disease: an unrecognized clinical entity in young, asymptomatic adults. *Eur. Heart J.* ehv306 (2015). doi:10.1093/eurheartj/ehv306
106. Siler, S. Q., Neese, R. a, Christiansen, M. P. & Hellerstein, M. K. The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. *Am. J. Physiol.* **275**, E897–907 (1998).
107. Bates, M. G. D. *et al.* Concentric hypertrophic remodelling and subendocardial dysfunction in mitochondrial DNA point mutation carriers. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **14**, 650–8 (2013).
108. Lorenzoni, P. J., Werneck, L. C., Kay, C. S. K., Silvado, C. E. S. & Scola, R. H. When

- should MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes) be the diagnosis? *Arq. Neuropsiquiatr.* **73**, 959–67 (2015).
109. Sproule, D. M. *et al.* Wolff-Parkinson-White syndrome in Patients With MELAS. *Arch. Neurol.* **64**, 1625–7 (2007).
 110. Majamaa-Voltti, K., Peuhkurinen, K., Kortelainen, M.-L., Hassinen, I. E. & Majamaa, K. Cardiac abnormalities in patients with mitochondrial DNA mutation 3243A>G. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2**, 12 (2002).
 111. Bates, M. G. D. *et al.* Defining cardiac adaptations and safety of endurance training in patients with m.3243A>G-related mitochondrial disease. *Int. J. Cardiol.* **168**, 3599–608 (2013).
 112. Zelnik, N., Axelrod, F. B., Leshinsky, E., Griebel, M. L. & Kolodny, E. H. Mitochondrial encephalomyopathies presenting with features of autonomic and visceral dysfunction. *Pediatr. Neurol.* **14**, 251–4 (1996).
 113. Hirano, M. *et al.* Renal complications in a patient with A-to-G mutation of mitochondrial DNA at the 3243 position of leucine tRNA. *Intern. Med.* **41**, 113–8 (2002).
 114. Damian, M. S., Seibel, P., Schachenmayr, W., Reichmann, H. & Dorndorf, W. VACTERL with the mitochondrial np 3243 point mutation. *Am. J. Med. Genet.* **62**, 398–403 (1996).
 115. Lorenc, A. *et al.* Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample. *Mitochondrion* **3**, 119–24 (2003).
 116. Lund, M. *et al.* Mitochondrial dysfunction and risk of cancer. *Br. J. Cancer* **112**, 1134–40 (2015).
 117. Shamsi, M. B. *et al.* Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J. Urol.* **24**, 150–4 (2008).
 118. Cassina, A. *et al.* Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production. *Biol. Reprod.* **93**, 119 (2015).
 119. Wang, J. *et al.* Mitochondrial DNA mutations may not be frequent in asthenospermic infertile men. *Mitochondrial DNA* **27**, 1364–5 (2016).
 120. Siwar, B.-G. *et al.* Two novel mutations in COII and tRNA(His) mitochondrial genes in asthenozoospermic infertile men. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450**, 610–5 (2014).
 121. Ruiz-Pesini, E. *et al.* Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 682–96 (2000).
 122. Lee, J. Y., Dada, R., Sabanegh, E., Carpi, A. & Agarwal, A. Role of genetics in azoospermia. *Urology* **77**, 598–601 (2011).
 123. Chae, J. H. *et al.* Clinical features of A3243G mitochondrial tRNA mutation. *Brain Dev.* **26**, 459–62 (2004).
 124. Ma, Y. *et al.* Clinical features of mitochondrial DNA m.3243A>G mutation in 47 Chinese families. *J. Neurol. Sci.* **291**, 17–21 (2010).
 125. Souza, P. V. S. d., Pinto, W. B. V. d. R. & Oliveira, A. S. B. Teaching NeuroImages: Longitudinally extensive transverse myelitis in MELAS. *Neurology* **86**, e37–e37 (2016).
 126. El-Hattab, A. W. *et al.* Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation. *Mol. Genet. Metab.* **105**, 607–14

(2012).

127. Ohama, E. *et al.* Mitochondrial angiopathy in cerebral blood vessels of mitochondrial encephalomyopathy. *Acta Neuropathol.* **74**, 226–33 (1987).
128. Iizuka, T. *et al.* Regional cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity during chronic stage of stroke-like episodes in MELAS -- implication of neurovascular cellular mechanism. *J. Neurol. Sci.* **257**, 126–38 (2007).
129. Testai, F. D. & Gorelick, P. B. Inherited metabolic disorders and stroke part 1: Fabry disease and mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes. *Arch. Neurol.* **67**, 19–24 (2010).
130. Shishido, F. *et al.* Cerebral oxygen and glucose metabolism and blood flow in mitochondrial encephalomyopathy: a PET study. *Neuroradiology* **38**, 102–7 (1996).
131. Sano, M., Ishii, K., Momose, Y., Uchigata, M. & Senda, M. Cerebral metabolism of oxygen and glucose in a patient with MELAS syndrome. *Acta Neurol. Scand.* **92**, 497–502 (1995).
132. Frackowiak, R. S., Herold, S., Petty, R. K. & Morgan-Hughes, J. A. The cerebral metabolism of glucose and oxygen measured with positron tomography in patients with mitochondrial diseases. *Brain* **111** (Pt 5, 1009–24 (1988).
133. Lindroos, M. M. *et al.* Cerebral oxygen and glucose metabolism in patients with mitochondrial m.3243A>G mutation. *Brain* **132**, 3274–84 (2009).
134. Iizuka, T., Sakai, F., Kan, S. & Suzuki, N. Slowly progressive spread of the stroke-like lesions in MELAS. *Neurology* **61**, 1238–1244 (2003).
135. Pauli, W., Zarzycki, A., Krzysztalowski, A. & Walecka, A. CT and MRI imaging of the brain in MELAS syndrome. *Pol. J. Radiol.* **78**, 61–5 (2013).
136. Ito, H., Mori, K. & Kagami, S. Neuroimaging of stroke-like episodes in MELAS. *Brain Dev.* **33**, 283–8 (2011).
137. Weiduschat, N. *et al.* Cerebral metabolic abnormalities in A3243G mitochondrial DNA mutation carriers. *Neurology* **82**, 798–805 (2014).
138. Finsterer, J. Laminar cortical necrosis in mitochondrial disorders. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **111**, 655–8 (2009).
139. Tschampa, H. J., Urbach, H., Greschus, S., Kunz, W. S. & Kornblum, C. Neuroimaging characteristics in mitochondrial encephalopathies associated with the m.3243A>G MTTL1 mutation. *J. Neurol.* **260**, 1071–80 (2013).
140. Renard, D., Campello, C., Le Floch, A., Castelnovo, G. & Taieb, G. Globus pallidus and substantia nigra hypointensities on T2-weighted imaging in MELAS. *J. Neurol.* **259**, 2720–2 (2012).
141. Apostolova, L. G., White, M., Moore, S. A. & Davis, P. H. Deep white matter pathologic features in watershed regions: a novel pattern of central nervous system involvement in MELAS. *Arch. Neurol.* **62**, 1154–6 (2005).
142. Virtanen, S. M. *et al.* Voxelwise analysis of diffusion tensor imaging and structural MR imaging in patients with the m.3243A>G mutation in mitochondrial DNA. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* **32**, 522–6 (2011).

143. Härmäläinen, R. H. *et al.* Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3622–30 (2013).
144. Kubota, Y., Ishii, T., Sugihara, H., Goto, Y. & Mizoguchi, M. Skin manifestations of a patient with mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and strokelike episodes (MELAS syndrome). *J. Am. Acad. Dermatol.* **41**, 469–73 (1999).