

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

MELAS: DA QUEIMA AO LABORATÓRIO

Miguel Barros Marques

M

2018



U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

MELAS: DA QUEIMA AO LABORATÓRIO

MIGUEL BARROS MARQUES

201203312

miguelbarrosmarques@gmail.com

ORIENTAÇÃO: DR. ARLINDO PAULO DE SÁ GUIMAS

Assistente Hospitalar Graduado no Centro Hospitalar Universitário do Porto

Colaborador Externo de Medicina II no MIM do ICBAS

AFILIAÇÃO: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Rua de Jorge Viterbo Ferreira nº 228, 4050-313 Porto, Portugal

Porto, maio de 2018

Aluno

Miguel Barros Marques

Miguel Barros Marques

Porto, maio de 2018

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Dr. Arlindo Paulo de Sá Guimas, por me acompanhar de forma incondicional ao longo desta longa aventura, pela transmissão de conhecimentos, pela sua capacidade de simplificação e pragmatismo e por me ensinar a pensar de forma criativa, livre e desformatada.

RESUMO

Introdução: As doenças mitocondriais caracterizam-se por uma limitação na fosforilação oxidativa. Outrora foram consideradas raras, mas graças ao desenvolvimento da genética têm-se observado um franco progresso nesta área e atualmente assumem-se como uma importante causa de disfuncionalidade metabólica. Tratam-se de um conjunto de doenças extremamente heterogêneas clínica, bioquímica e geneticamente e os órgãos mais afetados são aqueles com maiores exigências energéticas, tais como o sistema nervoso, músculo esquelético e cardíaco e rim e fígado. A encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios *stroke-like* (pseudoenfartes), mais vulgarmente conhecida por MELAS, é uma das doenças mitocondriais de herança materna mais frequentes. Caracteriza-se por um amplo quadro de manifestações multissistêmicas com destaque para o envolvimento neurológico e muscular bem como a cardinal lactacidemia.

Objetivos: Esta dissertação tem por objetivo a apresentação de um caso clínico de MELAS. De forma complementar, será feita uma revisão deste grupo nosológico, com especial incidência na MELAS. As doenças hereditárias do metabolismo são ainda muito subestimadas na comunidade médica e com esta dissertação pretende-se chamar à atenção para as mesmas.

Caso clínico: Trata-se de um exemplo paradigmático de MELAS, à apresentação clínica começa-se por excluir outras patologias e, simultaneamente, a hipótese de se tratar de um distúrbio do metabolismo vai ganhando força, sendo que só após se reunir evidências clínicas e bioquímicas suficientes se procede à confirmação do diagnóstico através do estudo genético.

Conclusões: As doenças mitocondriais constituem uma das principais causas de disfunção do metabolismo. O estado de arte destas entidades é ainda extremamente limitado e a MELAS, embora sendo uma das mais frequentes e melhor definidas, não é exceção. É impreterível investir no desenvolvimento de soluções diagnósticas e terapêuticas, bem como um maior empenho da comunidade científica em divulgar e fomentar o interesse e curiosidade pelas doenças raras e por MELAS.

Termos MeSH: MELAS; Doenças Mitocondriais; Doenças do Metabolismo; Encefalopatia Mitocondrial; Acidose Láctica.

ABSTRACT

Introduction: Mitochondrial diseases are best known for its impaired energy production. They used to be considered rare but thanks to improvements in genetics we have seen a major development regarding these diseases and are now an important cause for metabolic disorders. This group of disease has an extremely heterogeneous presentation in terms of its clinical manifestations, biochemistry findings and genetics, and the most affected organs are those with high energy demand, such as the nervous system, skeletal and cardiac muscle, kidney and liver. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, best known as MELAS, is one of the most frequent maternally inherited mitochondrial disorders, it has a broad spectrum of multisystemic manifestations highlighting the neurologic and muscular impairment and the almost universal lactic acidosis.

Aim: This dissertation has the aim to present a clinical case of MELAS. Additionally, a review of this nosologic group will be made, with special attention to MELAS. The inherited metabolic disorders are usually neglected and another aim of this dissertation is to address this issue drawing some attention to this group of diseases.

Clinical case: It's a paradigmatic case o MELAS, initially other possible causes for the clinical manifestations are excluded and then a metabolic disorder is suspected, after collecting enough clinical and laboratorial data the diagnosis is confirmed with a genetic study.

Conclusions: Mitochondrial disorders are known for its role in metabolic disfunction. MELAS is one of the most common and best established mitochondrial disorders but, such as the rest of mitochondrial diseases, it's still very poorly understood. It's required investing in the development of new diagnostic and therapeutic solution, as well as greater commitment of the scientific community in promoting and fostering interest and curiosity for rare diseases and MELAS.

Mesh terms: MELAS; Mitochondrial Diseases; Metabolic Diseases; Mitochondrial Encephalomyopathy; Lactic Acidosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADMA - Dimetilarginina Assimétrica

ASL - Argininosuccinato Liase

ASS - Argininosuccinato Sintetase

ATP - Adenosina Trifosfato

COX – Citocromo C Oxidase

CTE - Cadeia Transportadora de Eletrões

DDAH - Dimetilarginina Dimetilaminohidrolase

FADH₂ - Dinucleótido de Flavina e Adenina reduzido

MELAS - Encefalomiopatia mitocondrial, Acidose láctica e Pseudoenfartes

mtDNA - DNA mitocondrial

NADH - Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Reduzida

NO - Óxido Nítrico

NOS - Sintetase do Oxido Nítrico

nuDNA - DNA nuclear

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PM6M - Prova de 6 minutos de Marcha

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNS - Espécies Reativas de Nitrogénio

ROS - Espécies Reactivas de Oxigénio

rRNA - RNA ribossomal

TC - Tomografia Computorizada

tRNA - RNA transferência

ÍNDICE

MELAS: DA QUEIMA AO LABORATÓRIO	i
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUÇÃO	1
DEFINIÇÃO	2
EPIDEMIOLOGIA	3
A MITOCÔNDRIA	4
PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA CÉLULA	4
FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA	4
GENÉTICA MITOCONDRIAL	4
PARTICULARIDADES DA GENÉTICA MITOCONDRIAL.....	5
FISIOPATOLOGIA MELAS	7
APRESENTAÇÃO CLÍNICA	9
DIAGNÓSTICO.....	11
CLÍNICO	11
EXAMES COMPLEMENTARES DE DIAGNÓSTICO.....	11
Bioquímica sanguínea	11
Neuroimagem	11
Biópsia muscular	12
Diagnóstico genético	12
ABORDAGEM TERAPÊUTICA	14
INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA OU MELAS?.....	15
CASO ÍNDICE	15
FOLLOW UP.....	15
CARACTERIZAÇÃO FAMILIAR.....	16
DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÃO.....	17
FIGURAS	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fisiopatologia de MELAS.....	21
Figura 2 – Biópsia Muscular.....	22
Figura 3 – Genograma.....	22

INTRODUÇÃO

Proposto por Benda em 1898, o termo mitocôndria é originário do grego *mítos* (fio) e *khóndros* (cartilagem), em referência ao seu aspeto durante a espermatogénese (1). Desde o início do século vinte que este organelo representa o paradigma do metabolismo energético celular, responsável, entre outras funções, pela fosforilação oxidativa (2). Embora o genoma mitocondrial estivesse já descrito desde 1967 só em 1988 se introduziu o conceito de mutações patogénicas do DNA mitocondrial (mtDNA) (3, 4). As doenças mitocondriais, que se caracterizam por uma limitação na fosforilação oxidativa, foram outrora consideradas raras e esotéricas, mas graças a desenvolvimentos no campo da genética, principalmente no que à sequenciação do genoma mitocondrial e identificação de mutações patogénicas diz respeito, têm-se observado um franco progresso nesta área da ciência. Atualmente as doenças mitocondriais assumem-se como uma importante causa de disfuncionalidade metabólica com uma prevalência estimada de pelo menos 1:5000 (5). Tratam-se de um conjunto de doenças extremamente heterogéneas clínica, bioquímica e geneticamente. O atingimento pode ser mono ou multissistémico, dar-se de forma aguda ou insidiosa e ocorrer em qualquer fase da vida, sendo os órgãos mais afetados aqueles com maiores necessidades energéticas. Embora nas últimas duas décadas o conhecimento sobre as mutações patológicas na origem das doenças mitocondriais seja maior, o mecanismo que permite relacionar as alterações genotípicas com as manifestações fenotípicas permanece ainda incompreendido. O que é atribuível, em parte à complexidade da genética mitocondrial.

DEFINIÇÃO

A encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e pseudoenfartes, mais vulgarmente conhecida por MELAS, é uma das doenças mitocondriais de herança materna mais frequentes. Descrita pela primeira vez em 1984 (6) só em 1990 se descobriu a mutação genética responsável por 80% dos casos, nomeadamente a substituição de adenina para guanina na posição 3243 do gene MT-TL1 do DNA mitocondrial (7, 8). Caracteriza-se por um amplo quadro de manifestações multissistémicas com destaque para o envolvimento neurológico, nomeadamente convulsões, epilepsia, demência, cefaleias recorrentes, perda auditiva e atraso cognitivo, cuja etiologia se pensa estar nos pseudoenfartes. Para além das manifestações neurológicas também é frequente o envolvimento muscular, cardíaco, gastrointestinal, endócrino, bem com a cardinal lactacidemia.

EPIDEMIOLOGIA

Por definição, a prevalência da MELAS é extremamente difícil de averiguar. Variáveis como a geografia, amostra, metodologia e a própria aleatoriedade e imprevisibilidade da doença dificultam a obtenção de estimativas precisas e exatas. No Japão a prevalência da MELAS estima-se que seja de 0,2/100.000 (9). Por outro lado, a prevalência da mutação m.3243A>G, que embora não sendo específica da MELAS se associa com maior frequência a esta doença, foi estimada em 16,3/100.000 na Finlândia e em 236/100.000 na Austrália (10-12). A prevalência e incidência globais são ainda desconhecidas.

A MITOCÔNDRIA

Para uma melhor compreensão das doenças mitocondriais, e da MELAS em particular, é fundamental perceber o papel das mitocôndrias no metabolismo celular bem como o das suas particularidades genéticas.

PAPEL DA MITOCÔNDRIA NA CÉLULA

As mitocôndrias são organelos de dupla membrana presentes em todas as células humanas nucleadas. Através da fosforilação oxidativa são responsáveis pela produção energética celular, sob a forma de ATP. Embora esta seja a sua principal e mais importante função as mitocôndrias desempenham ainda uma série de outras funções como a regulação da apoptose, proliferação e diferenciação celular, destoxificação de espécies reativas de oxigénio, regulação de iões como o ferro e cálcio, oxidação de ácidos gordos, biossíntese de aminoácidos, entre outras (2, 13, 14). O número de mitocôndrias por célula é muito variável, com os tecidos mais dependentes energeticamente a recorrerem a um maior número de mitocôndrias para suprir as suas necessidades. É por este razão que na eventualidade de uma doença mitocondrial os órgãos mais afetados são o sistema nervoso e o músculo esquelético e cardíaco, daí que em muitos casos as doenças mitocondriais sejam também designadas por encefalomiopatias mitocondriais. Adicionalmente também o fígado, rins e sistema endócrino podem estar envolvidos pela elevada necessidade energética (13, 15, 16).

FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A fosforilação oxidativa está localizada na membrana interna mitocondrial, onde se encontra a cadeia transportadora de eletrões (CTE). Esta é constituída por cinco complexos (I-V) que permitem a oxidação dos substratos NADH e FADH₂ para gerar um gradiente de protões no espaço intermembranar. Este gradiente vai, posteriormente, servir para que, através do complexo V (ATP sintetase), seja realizada a fosforilação de ADP em ATP, e a tua libertação no citosol (13, 16, 17). Na presença de oxigénio, cada molécula de glicose permite gerar 32 ATP.

GENÉTICA MITOCONDRIAL

Embora a grande maioria (cerca de 900) das proteínas mitocondriais sejam

codificadas a partir de DNA nuclear (nuDNA) o DNA mitocondrial (mtDNA) tem um papel extremamente importante na fosforilação oxidativa (2). Formado por 16569 pares de bases organizadas em círculo o mtDNA é responsável por albergar um total de 37 genes. Destes 37 genes, 2 são de RNA ribossômico (rRNA), 22 são de RNA de transferência (tRNA) e 13 codificam proteínas estruturais todas elas pertencentes à CTE. De todos os cinco complexos que integram a CTE apenas o complexo II é exclusivamente com origem em proteínas codificadas através de DNA nuclear, todos os restantes consistem numa mistura de proteínas codificadas a partir de DNA mitocondrial e nuclear (13, 15, 18).

PARTICULARIDADES DA GENÉTICA MITOCONDRIAL

Ao contrário do DNA nuclear o DNA mitocondrial tem um padrão de hereditariedade distinto que permite explicar a heterogeneidade fenotípica deste grupo de doenças. Ao todo são cinco as particularidades que definem o genoma mitocondrial: hereditariedade materna, segregação replicativa, heteroplasmia, efeito limiar e efeito *bottleneck*.

Cada célula humana nucleada possui entre centenas e milhares de mitocôndrias. Por sua vez cada mitocôndria contém até 10 cópias de mtDNA. Consequentemente cada célula possui um número de cópias de mtDNA que pode variar entre 1.000 e 100.000 (19).

Durante a fertilização, as mitocôndrias provenientes do espermatozoide são marcadas com ubiquitina para destruição proteolítica pelo zigoto. Desta forma o zigoto herda apenas mitocôndrias maternas. Assim, todos os filhos de uma mãe afetada serão afetados mas nenhum filho dum pai afetado o será (20).

Ao contrário do que ocorre com o genoma nuclear, cuja segregação é estritamente controlada nos processos de meiose e mitose, a replicação e divisão mitocondrial trata-se de um evento estocástico. Neste processo, denominado de segregação replicativa, as múltiplas cópias de mtDNA distribuem-se aleatoriamente pelas várias mitocôndrias que, por sua vez, se distribuem aleatoriamente pelas duas células filha (21).

Tal como o genoma nuclear também o DNA mitocondrial pode sofrer mutações espontâneas. Como cada célula possui milhares de cópias de DNA mitocondrial podem coexistir, na mesma célula e em proporções variáveis, cópias de DNA normal e mutante, num estado designado de heteroplasmia (22).

À medida que as células heteroplásmicas se dividem ocorre acumulação de mtDNA mutado, o que permite explicar o facto deste grupo de doenças agravar com a

idade dos pacientes. Trata-se de um processo ainda incompreendido mas que se pensa dever, em parte, ao facto de algumas cópias de mtDNA mutado terem vantagem replicativa (20).

A presença de mtDNA mutado não é, no entanto, suficiente para comprometer a função celular e a fosforilação oxidativa em particular. Só quando o rácio de mtDNA mutado/normal excede um determinado limiar é que ocorre uma tradução fenotípica da doença (21, 23). Este fenómeno, designado de efeito limiar, depende do tipo de tecido, com os tecidos mais ávidos energeticamente a terem limiares mais baixos, e do tipo de doença mitocondrial em questão. No caso concreto da MELAS a doença manifesta-se quando a carga de mutação é superior a 70% (19). Na base do efeito limiar encontra-se a capacidade que as mitocôndrias têm de se fundirem e dividirem dentro da própria célula, o que permite que o mtDNA normal complemente o mtDNA mutante e assim se compense, até certo limite, as consequências das mutações (20).

Uma das mais importantes particularidades das doenças mitocondriais, e que permite explicar a variabilidade geno e fenotípica entre progenitores e descendentes e entre irmãos, é o *bottleneck* genético. Na grande maioria das divisões celulares a segregação replicativa distribui de forma aleatória, mas equitativa, todo o mtDNA pelas duas células filhas. Nas fases iniciais da oogénese, no entanto, o número de cópias de mtDNA sofre grande redução, o que afeta drasticamente o rácio mtDNA mutado/normal que é segregado para a célula filha. Assim, uma mãe sem manifestações clínicas da doença pode ter descendentes também eles não afetados ou, por outro lado, com manifestações clínicas que podem ir de leves a severas (22).

Este conjunto de particulares da genética mitocondrial são a base da complexa hereditariedade, expressão fenotípica e prognóstico das doenças mitocondriais. A segregação replicativa e a heteroplasmia, que levam a que o rácio de mt DNA mutado/normal varie não só consoante o tecido mas também consoante a célula, aliados ao efeito limiar, dependente do tipo de doença e do tipo de tecido, levam a que este grupo de doenças se caracterize por uma penetrância reduzida e uma expressão variável e aleatória. Por sua vez o *bottleneck* genético contribui para a variabilidade clínica entre pacientes e mesmo entre familiares (22).

FISIOPATOLOGIA MELAS

A fisiopatológica da clínica da MELAS é ainda um tema controverso e incompreendido. Na base desta patologia encontra-se uma panóplia de possíveis mutações genéticas dentre as quais se destaca a m.3243A>G no gene MT-TL1, responsável por 80% dos casos da MELAS (7, 8). No gene MT-TL1 temos ainda a m.3271T>G e a m.3252A>G que representam, respetivamente, aproximadamente 7,5% e 5% dos casos (24). Para além do gene MT-TL1 também o gene MT-ND5 está envolvido em menos de 15% dos casos (24).

A explicar o quadro clínico pensa-se estar um conjunto de três principais mecanismos interdependentes: comprometimento da fosforilação oxidativa, proliferação mitocondrial e défice de NO (Figura 1).

Como visto anteriormente, várias podem ser as mutações genéticas causadores da MELAS, porém todas elas têm em comum o facto de levarem a uma redução na síntese dos complexos da CTE, devida a diminuição da translação proteica ou, de forma direta, por defeitos a nível desses mesmos complexos (25).

Por sua vez, a deficiente produção energética estimula uma proliferação mitocondrial compensatória com acumulação de mitocôndrias nos pericitos de capilares, nas células endoteliais e nas células musculares lisas de artérias piais e pequenas artérias cerebrais (14, 26). O resultado final é uma angiopatia que afeta principalmente artérias cerebrais de pequeno calibre e arteríolas e capilares (14, 27).

Para a clínica da MELAS contribui também a deficiente produção de NO. O NO, entre outras funções, contribui para homeostasia dos vasos sanguíneos. Ao inibir as células de músculo liso permite que os mesmos se mantenham patentes. Para a deficiência de NO no contexto da MELAS podem apontar-se várias razões.

O NO é sintetizado a partir de arginina pela enzima sintetase do óxido nítrico (NOS). A arginina é um aminoácido condicionalmente essencial, pois embora a síntese endógena seja suficiente para suprimir as necessidades diárias de um adulto saudável o mesmo não se aplica para os recém nascidos, crianças, ou adultos sob stress catabólico ou disfunção intestinal ou renal. Assim, num adulto saudável, uma das mais importantes fontes de arginina é a síntese *de novo* a partir citrulina, via enzimas argininosuccinato sintetase e argininosuccinato liase. Por sua vez, a citrulina é proveniente da síntese *de novo* ao nível dos enterócitos do intestino delgado, um processo ATP dependente e que no contexto de disfunção mitocondrial está diminuído. É, portanto, a hipocitrulinemia resultante da disfunção mitocondrial que vai conduzir à diminuição da síntese de NO neste contexto (14, 25, 28).

Como abordado anteriormente, a mitocôndria tem um importante papel na regulação e destoxificação de espécies reativas de oxigênio. No contexto da MELAS esta função fica comprometida e a célula entra num estado de stress oxidativo com produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS). O stress oxidativo afeta a disponibilidade de NO não só de forma direta, através da diminuição da atividade da NOS, mas também de forma indireta, com o desvio de NO para a síntese de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (25). Por outro lado, o stress oxidativo também pode comprometer a função da dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH) que ao ser um catabolizador da dimetilarginina assimétrica (ADMA) vai levar ao aumento da sua concentração. Uma vez que a ADMA é um inibidor endógeno da NOS o resultado final vai ser a diminuição de produção de NO (29).

Uma das particularidades e especificidades da MELAS, que a diferencia de todas as restantes doenças mitocondriais, é a atividade respiratória residual. Ao contrário do que seria de esperar, a atividade da citocromo c oxidase (COX) (Complexo IV) está apenas parcialmente reduzida no caso da MELAS e pensa-se que esta seja uma das razões para a severidade fenotípica da MELAS. Em resposta ao défice de atividade da COX a proliferação mitocondrial é estimulada levando a que a atividade total da COX possa estar diminuída, normal ou até aumentada face ao normal. Uma das consequências da atividade aumentada da COX é o sequestro de NO. A COX reage com o NO mas perante um aumento da sua atividade total há uma carência relativa de NO, resultando no seu sequestro e conseqüente diminuição da disponibilidade.

Por fim, também a angiopatia mitocondrial, resultante da proliferação mitocondrial, induz uma disfunção endotelial com comprometimento da síntese de NO.

A soma de todos estes fatores irá ter como resultante uma disfunção multiorgânica que será abordada em maior detalhe de seguida.

APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Conforme discutido no ponto anterior o cerne fisiopatológico da MELAS é o déficit energético resultante da deficiente fosforilação oxidativa. Assim, pese embora o acrónimo sugira que se trata de uma encefalomiopatia com lactacidemia concomitante, esta doença é verdadeiramente multissistémica (14).

A apresentação clássica e que define a MELAS enquanto síndrome consiste numa tríade composta por pseudoenfartes, encefalopatia e miopatia com acidose láctica e/ou fibras vermelhas rotas (25). As crianças e adolescentes são os grupos etários mais afetados, com 70% dos pacientes a manifestarem a doença entre os 2 e 20 anos de idade (30).

A nível neurológico a característica cardinal são os pseudoenfartes, presentes em 84 a 99% dos pacientes. Esta denominação deve-se ao facto destes eventos não se distribuírem por territórios vasculares mas sim de forma aleatória e assimétrica, afetando predominantemente os lobos temporal, parietal e occipital e poupando a substância branca profunda. Clinicamente podem manifestar-se por afasia, perda visual cortical, déficit motor, cefaleias, convulsões, entre outros. Embora parcialmente reversíveis estes eventos vão levar a um acumular de lesões que vão conduzir à progressão da doença. Na génese destes eventos está a hipoperfusão das regiões afetadas, que se deve à angiopatia mitocondrial e déficit de NO (14, 24, 25).

Na génese da maioria das manifestações crónicas do SNC estão envolvidos essencialmente dois processos, a disfunção neuronal gerada pela insuficiência mitocondrial e a sucessiva e progressiva acumulação de lesões resultantes dos pseudoenfartes. A demência, presente em 40 a 90% dos pacientes, pode manifestar-se por défices executivos, de memória, atenção, linguagem, perceção e inteligência. Epilepsia, com uma prevalência entre 71 e 96%, pode apresentar sob a forma de crises generalizadas ou focais. As cefaleias recorrentes, em 54 a 91% dos casos, são mais frequentemente unilaterais e muitas vezes associadas a sintomas visuais ou sensitivos. Perda auditiva, em 71 a 77% dos casos, pode fazer parte do quadro de apresentação. Neuropatia periférica, trata-se de uma manifestação crónica e progressiva com déficit motor e sensitivo (principalmente propriocepção e vibração) de distribuição distal e que afeta os membros inferiores primeiro (14, 24, 25).

Outra das manifestações cardinais é a miopatia que se manifesta mais frequentemente por intolerância ao exercício, 73 a 100%, e fraqueza muscular, 42 a 89%. Nas crianças leva a um atraso do desenvolvimento motor em 23% dos casos. Na

gênese da miopatia que se verifica na MELAS está a deficiente produção energética mitocondrial e a deficiência de NO. No caso da deficiência de NO esta leva a uma diminuição da perfusão muscular não só em condições basais como também, e especialmente, em condições de esforço, o que explica a intolerância ao exercício (14, 24, 25).

A acidose láctica, sérica e/ou do líquido cefalorraquidiano, é também uma manifestação muito frequente e está presente em 94% dos casos. Devido à deficiente fosforilação oxidativa ocorre um shunt do piruvato acumulado que é convertido pela lactato desidrogenase em ácido láctico. Embora este processo também gere ATP, fá-lo com uma eficiência muita inferior à da respiração aeróbica, 2 moléculas de ATP contra 36 a 38 moléculas de ATP por molécula de glucose (14, 24, 25).

Existem ainda um conjunto de outras manifestações menos frequentes mas para os quais devemos estar igualmente alerta à hora de suspeitar da MELAS. A nível gastrointestinal a mais frequente são os vômitos cíclicos ou recorrentes e a incapacidade de ganhar peso nas crianças. Por outro lado, pode também desenvolver-se uma cardiomiopatia, mais frequentemente hipertrófica, e anormalidades da condução cardíaca. O desenvolvimento de diabetes, mais frequentemente de tipo 2, é também uma das possíveis consequência da MELAS, havendo, adicionalmente, registo de casos de diabetes tipo 1. A nível endócrino outra das manifestações mais frequentes é a baixa estatura (14, 24, 25).

Por fim, como doença verdadeiramente multissistémica, é importante frisar também manifestações noutros sistemas. A nível renal, o comprometimento da reabsorção tubular devido ao deficiente funcionamento das bombas sódio-potássio ATP dependentes crê-se ser a base para o desenvolvimento da síndrome de Fanconi. A nível dermatológico podem verificar-se manifestações como vitiligo e eritema difuso e há também registo de casos de hipertensão pulmonar e anemia crónica associados a MELAS (14, 24, 25).

DIAGNÓSTICO

CLÍNICO

Os mais recentes critérios de diagnóstico, propostos pelo comité japonês de estudo da MELAS, consideram que o diagnóstico é definitivo na presença de 2 critérios de categoria A e de 2 de categoria B. Os critérios de categoria A podem ser: cefaleias associadas a vômitos, convulsões, hemiplegia, amaurose cortical e neuroimagem reveladora de lesões focais. Por sua vez os critérios de categoria B são, essencialmente, dados laboratoriais, nomeadamente: lactatos aumentados no plasma ou fluído cefalorraquidiano, anormalidades mitocondriais na biopsia muscular e análise molecular reveladora de mutação compatível com MELAS (9).

EXAMES COMPLEMENTARES DE DIAGNÓSTICO

Bioquímica sanguínea

Uma vez que a acidose láctica é um sinal quase invariável da MELAS os marcadores bioquímicos mais específicos são a deteção de níveis aumentados de ácido láctico ou ácido pirúvico, no plasma ou fluído cefalorraquidiano (31). Níveis de lactatos séricos ou no fluído cefalorraquidiano, em jejum, acima de 3mmol/L ou 1,5mmol/L, respetivamente, apoiam o diagnóstico de doença mitocondrial (32).

Neuroimagem

O principal meio de imagem usado para o diagnóstico das lesões cerebrais na MELAS é a RMN. Na ponderação de T2 as lesões resultantes dos pseudoenfartes apresentam-se com um hipersinal e, ao contrário dos enfartes convencionais, não só não respeitam um território vascular bem como podem migrar de localização. Conforme já abordado, as regiões mais propícias ao desenvolvimento deste tipo de lesões são aquelas com maior demanda metabólica, nomeadamente os lobos temporal, parietal e occipital, bem como o tálamo. Também por esse facto o córtex cerebral é mais afetado que a substância branca profunda (24, 31).

Outra característica diferenciadora dos pseudoenfartes é o facto de na RMN de difusão se apresentarem com um coeficiente aparente de difusão aumentado, sendo que nos enfartes cerebrais convencionais o mesmo se apresenta reduzido (24).

Também a espectroscopia por RMN pode ter um importante papel diagnóstico

na MELAS, principalmente nos estágios iniciais da doença, quando ainda não há evidência de pseudoenfartes na RMN. Este método de imagem permite avaliar os metabólitos cerebrais e existe um consenso geral de que um pico de lactatos é um marcador sensível da doença (14, 31).

Biópsia muscular

Conforme abordado anteriormente, na MELAS ocorre uma proliferação mitocondrial compensatória que irá ter tradução ao nível das fibras musculares. O excesso de mitocôndrias acumula-se sob o sarcolema das células musculares e torna o seu contorno irregular, conferindo-lhes um aspeto rasgado. A biópsia é feita num dos membros sendo que usualmente se recorre ao quadríceps femoral ou ao deltoide. Ao microscópio a amostra biopsada apresenta-se como fibras vermelhas rotas perante a coloração de Gomori modificada e como fibras azuis rotas perante a coloração de succinato desidrogenase. Também o facto da atividade da COX estar apenas parcialmente reduzida na MELAS, ao contrário da maioria das restantes doenças mitocondriais, faz com que a marcação para este complexo seja muito sugestiva, embora não patognomónico. Para além de marcar as fibras musculares rotas a succinato desidrogenase é também um excelente marcador de proliferação mitocondrial, evidenciando o excesso de mitocôndrias que se acumula nas células musculares e endoteliais dos vasos intramusculares (14, 24).

Diagnóstico genético

Se perante uma clínica compatível com MELAS e após a realização dos ECdT anteriormente descritos existir uma forte suspeita MELAS devemos confirmar o diagnóstico através da análise genética. Cerca de 80% dos casos da MELAS são devidos à mutação m.3243A>G e aproximadamente 15% devidos à mutação m.3271T>C, ambas localizadas no gene MT-TL1. Embora menos frequentes estão também descritas outras variantes mutacionais no gene MT-TL1 e no gene MT-ND5, bem como uma panóplia de variantes numa série de outros genes, mas extremamente raras (24, 31).

Uma vez que as variantes mutacionais estão presentes em todos os tecidos, virtualmente qualquer amostra pode ser usada para detetar o mtDNA mutado, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os leucócitos sanguíneos são a amostra mais usada, no entanto são uma população em constante replicação e muito seletiva para as mutações de mtDNA, podendo dar-se o caso da mutação ser detetável noutros

tecidos que não os leucócitos. De entre as outras amostras disponíveis o sedimento urinário é a mais usada, uma vez que é de fácil acesso e contém grandes cargas mutacionais. Em última instância, e no caso da mutação não ser detetável pelas técnicas convencionais, pode recorrer-se a extratos de DNA musculares (14, 24, 31).

ABORDAGEM TERAPÊUTICA

Não existe qualquer tratamento curativo para a MELAS pelo que a abordagem terapêutica visa essencialmente melhorar o prognóstico, através da evicção de agentes com toxicidade mitocondrial e recorrendo a uma suplementação baseada em antioxidantes e cofatores ainda com pouca evidência científica de eficácia. Faz-se também uma abordagem sintomática e multidisciplinar com um follow up rotineiro dos pacientes para avaliar a progressão da doença e o desenvolvimento de complicações (14, 24, 25).

No que toca aos tóxicos mitocondriais deve ser evitado o consumo de álcool e tabaco e antibióticos como os *aminoglicosídeos* e *linezolida*. Adicionalmente também se deve cessar a terapêutica com *metformina*, que agrava a acidose láctica, o *ácido valpróico*, devido às suas repercussões a nível mitocondrial, e o *dicloroacetato*, por causar toxicidade para o sistema nervoso periférico (25).

Embora com pouco evidência científica, alguns ensaios clínicos demonstraram que a suplementação com *L-Arginina* pode ser benéfica durante pseudoenfartes. A injeção de *L-Arginina* intravenosa durante a fase aguda dos pseudoenfartes reduz a sua severidade e sintomatologia e a suplementação oral entre crises melhora a irrigação cerebral, reduzindo a sua frequência e severidade (33, 34).

INTOXICAÇÃO ALCOÓLICA OU MELAS?

CASO ÍNDICE

Doente sexo feminino, 21 anos, estudante. Recorre ao SU após episódio de lipotímia no recinto da “Queima das fitas”. Suspeita-se de intoxicação alcoólica que acabou por não ser confirmada. A história clínica revela fadiga com 6 meses de evolução, para esforços progressivamente menores, sem, no entanto, miopatia inflamatória. Após investigação laboratorial apresenta acidose láctica de etiologia não esclarecida (pH=7,28; pCO₂=25,4mmHg; pO₂=97mmHg; HCO₃⁻=14,1mEq/l; Lactatos=6,4mmol/l). Suspeita-se de uma doença metabólica e é internada para investigação.

A prova de sobrecarga glicémica e a prova de 6 minutos de marcha (PM6M) revelaram uma lactacidemia que agravava com a ingestão calórica e exercício, respetivamente. A PM6M também apresentava uma intolerância ao exercício (60% do valor normal estimando). As provas funcionais respiratórias, o eletrocardiograma (ECG), o ecocardiograma transtorácico (ECOTT), bem como o exame neurológico e respetiva RMN, eram normais

Perante este quadro a hipótese de se tratar de uma miopatia mitocondrial ganha peso e procede-se à biópsia muscular e estudo genético molecular.

A biópsia, à coloração de Gomori, revelou fibras moderadamente atrofiadas, poliédricas e dispersas, com fibras de coloração avermelhada à periferia, ou seja, fibras vermelhas rotas (Figura 2). A atividade da COX encontrava-se diminuída mas sem fibras COX negativas.

Os testes genéticos moleculares foram positivos para a mutação 3271T>C no gene MT-TL1, com atingimento heterogéneo dos tecidos: 40% nas células sanguíneas periféricas, 50% nas células renais e 60% nas células da mucosa oral.

FOLLOW UP

Após 5 anos de seguimento desenvolveu acidose láctica persistente e a intolerância ao exercício agravou ligeiramente, com uma PM6M de 55%. Manifesta também episódios de vômitos e náuseas ocasionais.

Ausência de défices motores, alterações retinianas ou défices auditivos. RM e TC cerebrais, ECO TT e provas de função respiratória normais.

Medicada com *arginina* 10g/dia e *bicarbonato* 1500 g/dia.

Evicção de agentes com toxicidade mitocondrial (*ácido valpróico*, antibióticos, álcool, tabaco e vacina vírus influenza anual).

CARACTERIZAÇÃO FAMILIAR

Avó: 74 anos, portadora de hipertensão, osteoporose e osteoartrite. Sem miopatia ou queixas musculares. Estudo genético molecular revela mutação 3271T>C com uma proporção de 5% nas células sanguíneas periféricas.

Mãe: 47 anos, saudável e sem queixas. Estudo genético molecular revela mutação 3271T>C com uma proporção de 25% nas células sanguíneas periféricas.

Tia: 49 anos, intolerância ao exercício. Estudo genético molecular revela mutação 3271T>C com uma proporção de 25% nas células sanguíneas periféricas e 40% nas células da mucosa oral. Não realizou biópsia muscular.

Tio: 45 anos, saudável e sem queixas. Não realizou teste genético molecular

Podemos ter uma melhor percepção da mutação através do genograma (Figura 3).

DISCUSSÃO

Conforme abordado ao longo desta dissertação, as doenças mitocondriais, e a MELAS em específico, embora bem definidas clinicamente, têm uma apresentação fenotípica extremamente heterogênea bem como uma penetrância altamente imprevisível. Esta família é ilustrativa deste mesmo paradigma.

Neste caso clínico a suspeita parte de uma acidose láctica inexplicada, que após exclusão de outras etiologias mais comuns e investigação laboratorial revela uma miopatia, sendo o diagnóstico de MELAS suspeitado, e confirmado após testes genéticos. Até à data, e após 5 anos de seguimento, a paciente apenas manifesta intolerância ao exercício e poucos sintomas gastrointestinais.

Enquadrando o caso índice na sua família apercebemo-nos de uma penetrância reduzida e uma expressão altamente variável e aleatória, muito típico desta família de doenças. Isto é explicado pelas especificidades das doenças mitocondrias, especialmente o efeito de bottleneck, que justifica a heterogeneidade feno e genotípica entre descendentes, e o efeito limiar e heteroplasmia que explicam a heterogeneidade fenotípica e dos sistemas atingidos, bem como a gravidade da sintomatologia.

CONCLUSÃO

As doenças mitocondriais constituem uma das principais causas de disfunção do metabolismo. O estado de arte destas entidades é ainda extremamente limitado e a MELAS, embora sendo uma das mais frequentes, não é exceção. Na gênese deste grupo nosológico estão mutações no DNA mitocondrial que, embora com apenas 16569 pares de base, é de extrema importância para a fosforilação oxidativa, uma vez que à exceção do complexo II todos os restantes quatro complexos da cadeia transportadora de eletrões integram proteínas codificadas pelo mtDNA. Devido às particularidades do DNA mitocondrial tratam-se de um conjunto de doenças extremamente heterogêneas clínica, bioquímica e geneticamente. A ausência de achados clínicos e bioquímicos característicos cria dificuldades diagnósticas, pelo que a sua classificação como doenças raras pode, na realidade, dever-se ao seu subdiagnóstico. Porém o paradigma das doenças mitocôndrias está a mudar e tem-se registado um crescente envolvimento e interesse da comunidade científica na sua investigação, o que poderá vir a permitir conhecer a sua real dimensão e desenvolvimento de soluções a nível diagnóstico e terapêutico.

Dentre as doenças mitocondriais a MELAS é a que se encontra melhor descrita, com uma tríade clínica e achados diagnósticos característicos. Trata-se de uma doença multissistémica e que, como tal, tem um amplo espectro de manifestações, pelo que o seu diagnóstico se mostra desafiante. Começando-se por uma suspeita clínica devemos passar à recolha de dados bioquímicos e, só por fim, confirmar o diagnóstico com um estudo genético. Um exemplo paradigmático desta abordagem é precisamente o caso clínico apresentado, no qual fica também claro a importância de conhecer as generalidades clínicas deste grupo de patologias para que, pelo menos, possam integrar a lista de possíveis diagnósticos diferenciais.

Se por um lado se tem realizado francos progressos no conhecimento clínico da MELAS, por outra parte as soluções terapêuticas são francamente limitadas, sem qualquer opção curativa até à data. A evicção de agentes com toxicidade mitocondrial deve ser preconizada e prescrevem-se antioxidantes e cofatores com poucas evidências de benefício e que visam apenas atrasar a progressão da doença. Pese embora o impacto limitado da medicina atual no prognóstico da MELAS devemos ter patente, especialmente enquanto médicos, a importância de apresentar ao paciente um diagnóstico, um veredicto quanto ao seu estado clínico.

O desconhecimento deste grupo nosológico é ainda bem patente, pelo que é

necessário um maior empenho da comunidade médica em divulgar e fomentar o interesse e curiosidade pelas doenças raras e por MELAS em particular. Só com a adoção deste tipo de postura, desinteressada e não conformista, se poderão realizar progressos em áreas da medicina que, pelas suas características, são proteladas para segundo plano, em detrimento de patologias cuja investigação tem, em teoria, um maior impacto benéfico para os pacientes.

Referências

1. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol.* 1981;91(3 Pt 2):227s-55s.
2. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
3. Clayton DA, Vinograd J. Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. *Nature.* 1967;216(5116):652-7.
4. Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 1988;331(6158):717-9.
5. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol.* 2008;63(1):35-9.
6. Pavlakis SG, Phillips PC, DiMauro S, De Vivo DC, Rowland LP. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol.* 1984;16(4):481-8.
7. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 1990;348(6302):651-3.
8. Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, Momoi T, Nihei K, Yanagisawa M, 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.* 1990;173(3):816-22.
9. Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, et al. MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(5):619-24.
10. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Karppa M, et al. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet.* 1998;63(2):447-54.
11. Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, Rochtchina E, Howard C, Mitchell P, et al. Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion.* 2007;7(3):230-3.
12. Uusimaa J, Moilanen JS, Vainionpää L, Tapanainen P, Lindholm P, Nuutinen M, et al. Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. *Ann Neurol.* 2007;62(3):278-87.
13. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(1):53-89.
14. Sproule DM, Kaufmann P. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1142:133-58.
15. McFarland R, Turnbull DM. Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *J Intern Med.* 2009;265(2):210-28.
16. Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain.* 2004;127(Pt 10):2153-72.
17. Koene S, Smeitink J. Mitochondrial medicine: entering the era of treatment. *J Intern Med.* 2009;265(2):193-209.
18. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
19. Magner M, Kolarova H, Honzik T, Svandova I, Zeman J. Clinical manifestation of mitochondrial diseases. *Dev Period Med.* 2015;19(4):441-9.
20. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell.* 2006;125(7):1241-52.
21. Fraser JA, Bioussé V, Newman NJ. The neuro-ophthalmology of mitochondrial disease. *Surv Ophthalmol.* 2010;55(4):299-334.
22. Khan NA, Govindaraj P, Meena AK, Thangaraj K. Mitochondrial disorders: challenges in diagnosis & treatment. *Indian J Med Res.* 2015;141(1):13-26.
23. Jenuth JP, Peterson AC, Shoubridge EA. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet.* 1997;16(1):93-5.
24. DiMauro S, Hirano M. Melas. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.
25. El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol Genet Metab.* 2015;116(1-2):4-12.
26. Sakuta R, Nonaka I. Vascular involvement in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol.*

1989;25(6):594-601.

27. Tokunaga M, Mita S, Sakuta R, Nonaka I, Araki S. Increased mitochondrial DNA in blood vessels and ragged-red fibers in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Ann Neurol*. 1993;33(3):275-80.

28. Luiking YC, Ten Have GA, Wolfe RR, Deutz NE. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;303(10):E1177-89.

29. El-Hattab AW, Emrick LT, Chanprasert S, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondria: role of citrulline and arginine supplementation in MELAS syndrome. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;48:85-91.

30. Hirano M, Pavlakis SG. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): current concepts. *J Child Neurol*. 1994;9(1):4-13.

31. Wang YX, Le WD. Progress in Diagnosing Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(13):1820-5.

32. Chinnery PF. Mitochondrial Disorders Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, et al., editors. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA)1993.

33. Koga Y, Akita Y, Junko N, Yatsuga S, Povalko N, Fukiyama R, et al. Endothelial dysfunction in MELAS improved by L-arginine supplementation. *Neurology*. 2006;66(11):1766-9.

34. Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Katayama K, et al. MELAS and L-arginine therapy. *Mitochondrion*. 2007;7(1-2):133-9.

FIGURAS

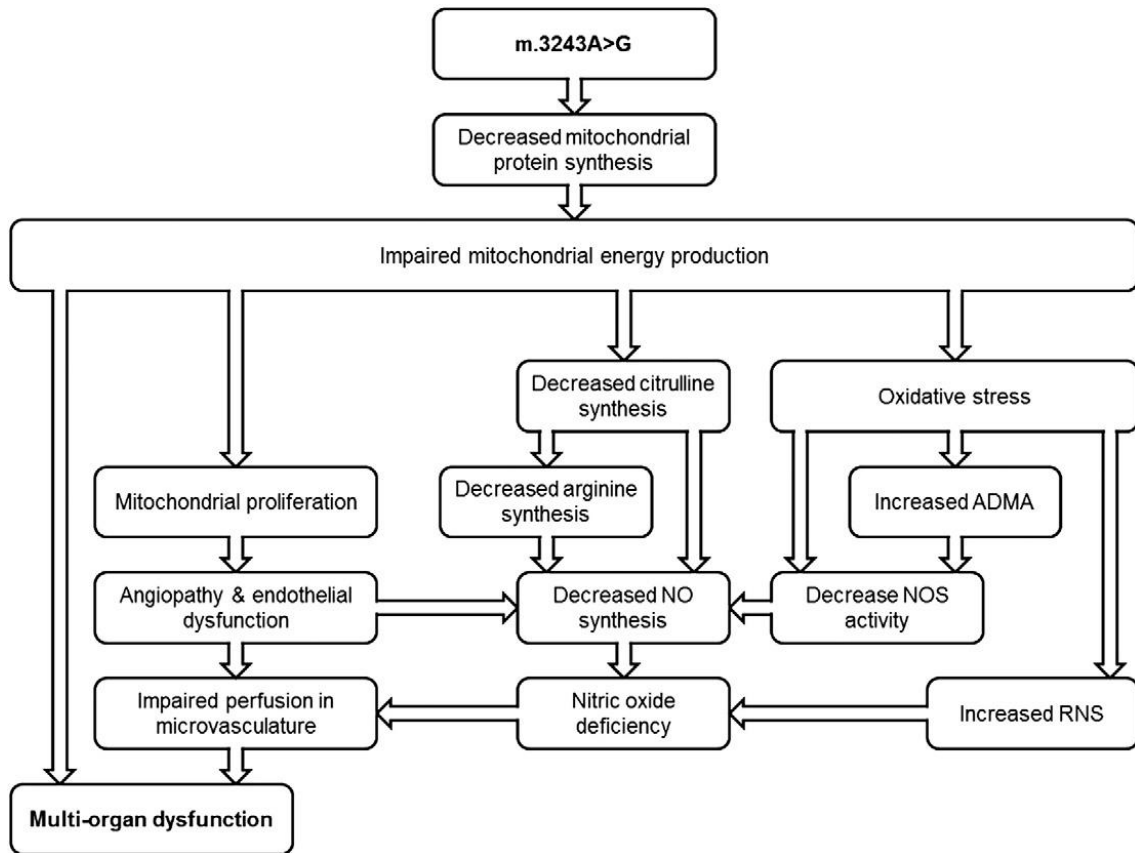


Figura 2 – Fisiopatologia de MELAS

Fonte: adaptado de (25)

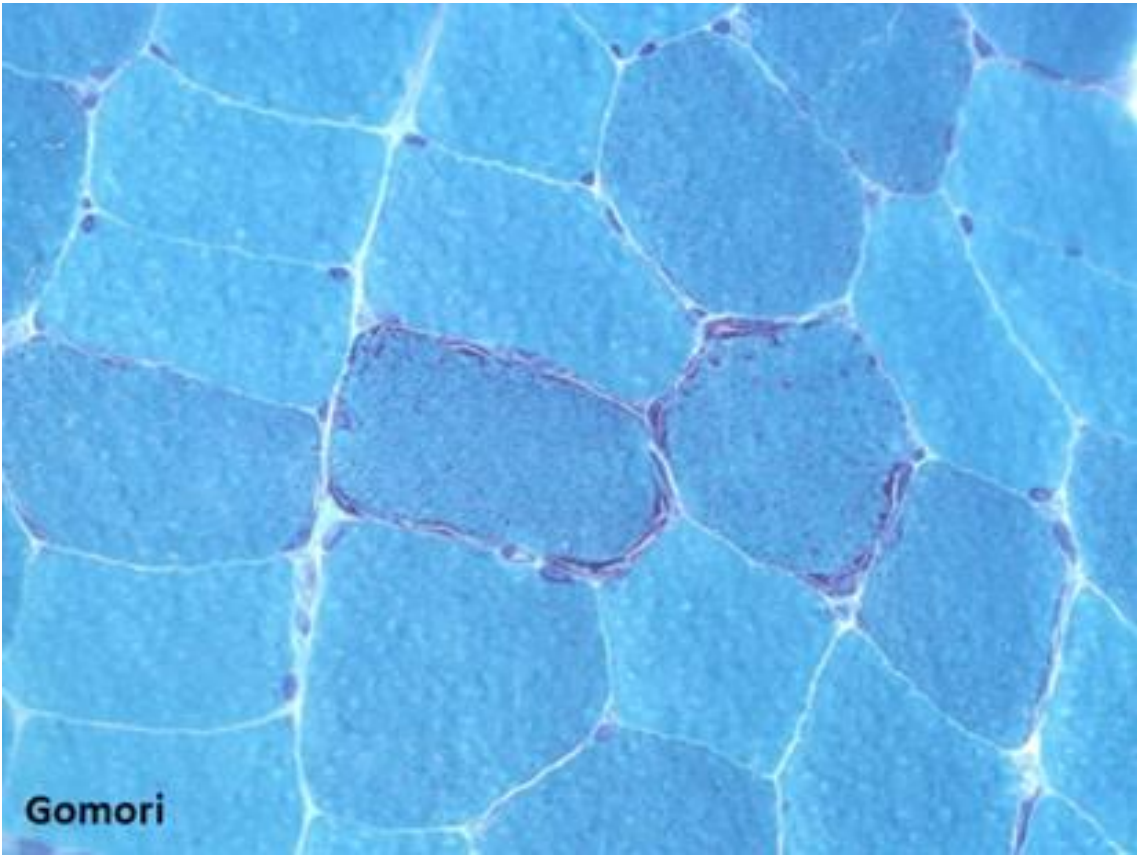


Figura 2 – Biópsia Muscular

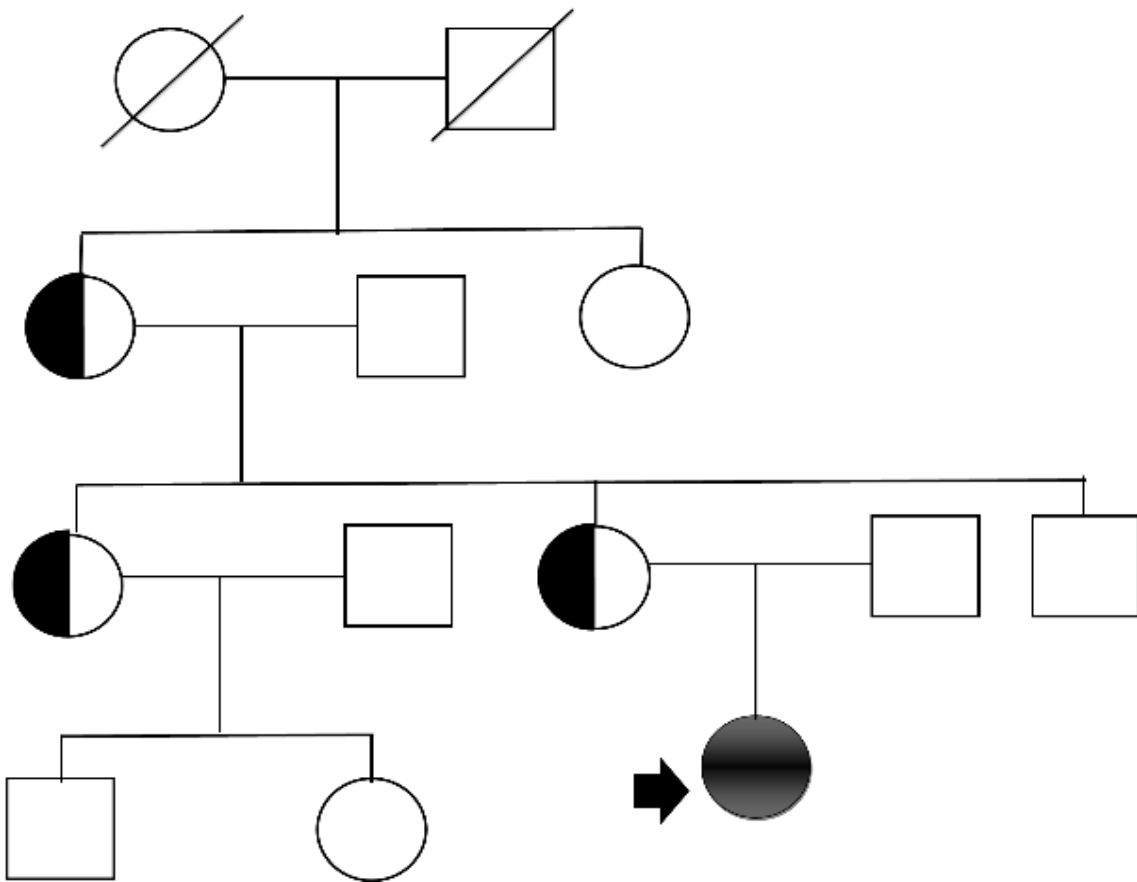


Figura 3 – Genograma