

Heterogeneidade Clínica de 6 Casos com a Mutação «MELAS» A3243G do DNA Mitocondrial

LAURA VILARINHO¹, LURDES RODRIGUES², ISABEL COELHO², HUGO ROCHA¹,
M. MELO PIRES³, ANTÓNIO GUIMARÃES^{3,4}

¹ Unidade de Biologia Clínica, Instituto de Genética Médica, Jacinto de Magalhães, Porto

² Serviço de Neurologia, Hospital de Nossa Senhora da Oliveira, Guimarães

³ Unidade de Neuropatologia, Hospital Geral de Santo António, Porto

⁴ Departamento de Patologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Abel Salazar, Porto

Resumo

Os autores descrevem três casos com apresentação clínica atípica de MELAS, assim como dois membros oligossintomáticos e um assintomático das duas famílias portadores da mutação A3243G do tRNA^{Leu(UUR)} do DNA mitocondrial. Em todos os casos, esta mutação pontual associada a doenças com hereditariedade materna, estava presente em heteroplasmia.

Palavras-Chave: Miopatias mitocondriais, DNA mitocondrial, mtDNA, mutação A3243G, MELAS.

Summary

Clinical Heterogeneity of the Mitochondrial DNA A3243G Mutation in 6 Cases

The authors describe three cases with atypical clinical presentation of MELAS, two oligosymptomatic and one asymptomatic members in two pedigrees. The diagnosis was confirmed by the presence of A3243G mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene of mitochondrial DNA. This point mutation associated to maternally-inherited disorders was heteroplasmic in all cases and tissues studied.

Key-Words: Mitochondrial myopathies, mitochondrial DNA, mtDNA, A3243G mutation, MELAS.

Introdução

As encefalomiopatias mitocondriais (EM) são um grupo heterogéneo de doenças com diferentes manifestações clínicas e bioquímicas. O músculo esquelético e o sistema nervoso central são os órgãos mais afectados⁽¹⁾. Inicialmente o diagnóstico era efectuado com base nos

dados clínicos e na observação de fibras rotas e vermelhas (*ragged red fibers* – RRFs) na microscopia óptica das biópsias musculares, quando coradas com o corante de tricrómio de Gomori modificado ou de fibras que não reagem com o corante histoquímico da citocromo *c* oxidase (fibras Cox-negativas)⁽²⁾.

Posteriormente os estudos bioquímicos levaram à identificação de défices específicos da cadeia respiratória mitocondrial. Contudo, rapidamente se verificou que nem as RRF, nem os dados bioquímicos isoladamente, poderiam levar a uma classificação sistemática das EM. Os avanços na genética molecular têm contribuído para uma melhor compreensão das bases genéticas destas doenças, e em cerca de 40% dos doentes são identificados rearranjos do DNA mitocondrial (mtDNA)⁽³⁻⁶⁾, normalmente deleções de grandes dimensões e em 30% uma mutação pontual num dos 22 genes dos RNAs de transferência codificados pelo mtDNA^(7,8). A mutação pontual mais comum (Fig. 1) é a transição A → G na posição 3243 do tRNA^{Leu(UUR)} identificada por dois grupos, em 1990^(9,10) em associação com o síndrome de encefalopatia mitocondrial, com acidose láctica e episódios *stroke-like* (MELAS).

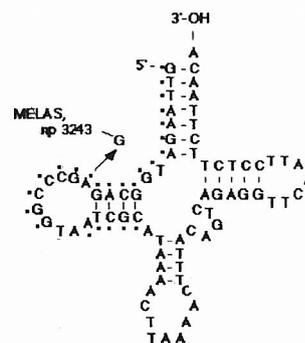


FIG. 1 – Representação esquemática do tRNA^{Leu(UUR)} com a mutação atípica de MELAS (A3243G).

Correspondência: Dr.ª Laura Vilarinho
Unidade de Biologia Clínica – Instituto de Genética
Médica – Jacinto de Magalhães – Praça Pedro Nunes
N.º 88 – 4050 Porto – Tel. 607 03 06 / Fax 607 03 99
E-mail: laura.vilarinho@igmjm.pt

Entregue para publicação em 27/02/98.
Aceite para publicação em 09/10/98.

Desde então, esta mutação já foi encontrada em 80% dos doentes com MELAS descritos na literatura ⁽¹¹⁾ e em 17% de casos com outros fenótipos clínicos ⁽¹²⁾.

O síndrome MELAS adquiriu a sua identidade com Pavlakis, em 1984 ⁽¹³⁾, através do estudo de dois novos casos e de mais nove revistos da literatura, dando relevância aos aspectos clínicos e à hereditariedade materna. Caracteriza-se por apresentar *strokes* antes dos 40 anos de idade, encefalopatia com convulsões e/ou demência, acidose láctica e/ou RRFs ^(14, 15). Outras características que também podem estar presentes são a hipoacúsia, cefaleias tipo *migraine* e vômitos recorrentes, com um desenvolvimento normal nos primeiros anos de vida. A natureza multissistémica de MELAS é atribuída à distribuição arbitrária das mitocôndrias mutadas, durante a embriogénese.

A ausência habitual de oftalmoplegia, retinopatia pigmentar, bloqueio cardíaco e a falta de *mioclonus*, polineuropatia periférica e atrofia óptica distingue MELAS de outras entidades distintas como a epilepsia mioclónica com RRFs (MERRF) e o síndrome de Kearns-Sayre (KSS).

MELAS não é a única expressão clínica da mutação 3243 do mtDNA. Alguns doentes com oftalmoplegia externa progressiva (PEO), diabetes mellitus e surdez de transmissão materna, ou com características habitualmente associadas a MERRF e ao KSS são portadores de esta mutação pontual ^(6, 12, 14). Recentemente encontramos esta mutação num doente com apresentação *Leigh-like* ⁽¹⁶⁾.

Objectivo

Analisar e discutir a heterogeneidade clínica e bioquímica associada à mutação A3243G do mtDNA. Os autores apresentam três probandus, e dois membros oligossintomáticos e um assintomático, das respectivas famílias.

Caso 1

H. N., de 6 anos, sexo masculino e raça caucasiana, é o segundo filho de pais não consanguíneos e sem história de doença neurológica familiar na linha materna.

O probandus teve uma gestação normal, parto de termo e eutócico, com Apgar ao 6.º minuto de 9; o seu peso à nascença era de 3500 g (percentil 50) e o comprimento de 50 cm (percentil 40).

O desenvolvimento psicomotor foi normal até aos três anos, altura em que iniciou queixas de astenia, anorexia, cansaço fácil e dores musculares nos membros inferiores. Posteriormente, entre os quatro e os cinco anos de idade, verificou-se um atraso de desenvolvimento

estatura-ponderal encontrando-se o peso e a estatura no percentil 10. Registaram-se também episódios de vômitos recorrentes, e no decorrer de um destes episódios foi detectado um sopro sistólico e hepatomegalia, ficando internado no Hospital Distrital de Guimarães, para estudo.

No exame objectivo, observou-se uma criança triste, apática e pouco colaborante. Detectou-se um sopro sistólico de grau II/III em VI no foco aórtico e uma hepatomegalia de 2 cm abaixo do rebordo costal. O exame neurológico evidenciou uma discreta ptose palpebral bilateral nos exercícios de facilitação, fraqueza muscular generalizada ao esforço e uma hiperreflexia miotática. A fundoscopia ocular revelou-se normal.

O ecocardiograma transtorácico demonstrou uma dilatação ligeira do ventrículo esquerdo (VE), uma depressão ligeira da função sistólica global do VE (fracção de ejeção de 52%), estruturas valvulares íntegras, sem persistência do canal arterial e sem coarctação da aorta sendo a favor de uma cardiomiopatia tipo dilatada. O electrocardiograma de longa duração (24 horas) detectou um ritmo sinusal em todo o registo, com uma frequência média de 112/minuto (84-162 b/min) e alguns períodos de arritmia sinusal durante a noite. A tomografia axial computadorizada (TAC) abdominal mostrou um fígado com dimensões nos limites superiores da normalidade para o grupo etário, sendo o exame dos restantes órgãos abdominais normal. A TAC cerebral, a electromiografia (EMG) com teste de estimulação repetitiva (miasténico) e a biópsia hepática não demonstraram quaisquer alterações.

A investigação metabólica sanguínea revelou um aumento da creatinafosfocinase (649 U/L), do lactato (6,2 mmol/l em jejum e 4,8 mmol/L pós-prandial, normal: < 2,4) da relação lactato/piruvato, bem como, da desidrogenase láctica (5 vezes o valor normal). A carnitina plasmática estava diminuída (27 µmol/L, normal: 35-70).

Foi realizada uma biópsia do deltóide, cujos exames histoquímico e histoenzimático evidenciaram uma densidade de RRFs muito elevada, (chegando a afectar em alguns fascículos mais de 20% das fibras) (Fig. 2) e de frequentes fibras Cox negativas (Fig. 3). O exame em microscopia electrónica evidenciou frequentes fibras com grandes aglomerados predominantemente subsarcolémicos de mitocôndrias de grande volume, vacuolizadas, com desaparecimento ou desorganização das cristas, e com muito frequentes, por vezes múltiplas, inclusões com estrutura paracristalina, alongadas e cuja face externa se fundia com a membrana interna da mitocôndria. Mais raramente, as mitocôndrias apresentam inclusões electodensas, esféricas, de tamanho variável, por vezes múltiplas na parte central da matriz. Estes aglomerados mitocondriais estavam sempre envolvidos por quantidade aumentada de glicogénio (Figs. 4 e 5).

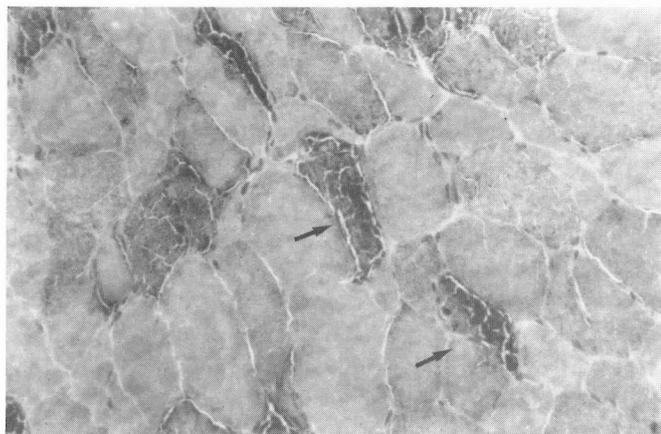


FIG. 2 – Corte histológico da biópsia muscular do doente 1, onde são visíveis frequentes fibras «ragged-red», assinaladas por setas (tricroímio de Gomori, modificada, x 430).

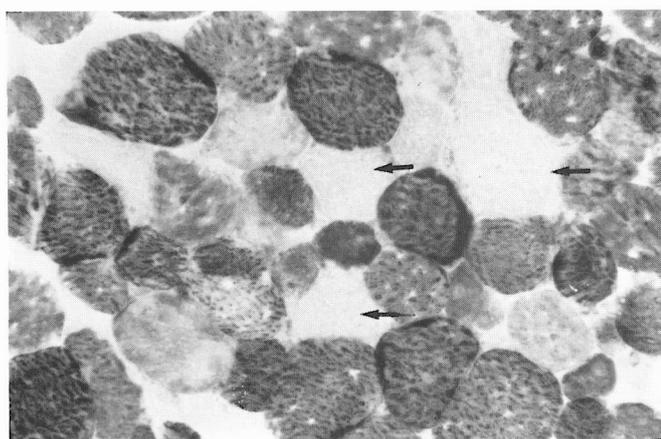


FIG. 3 – Corte histológico da biópsia muscular do doente 1, onde se observam fibras sem actividade da citocromo e oxidase, assinaladas por setas (Cox x 430).

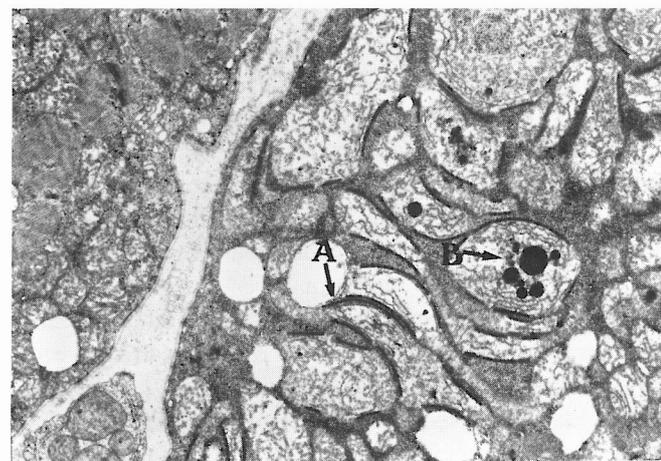


FIG. 4 – Aglomerado subsarcolémico de mitocôndrias anormais, volumosas, vacuolizadas com frequentes inclusões paracristalinas alongadas (A) e mais raramente inclusões esféricas electrodensas (B) (M.E. x 10 000).

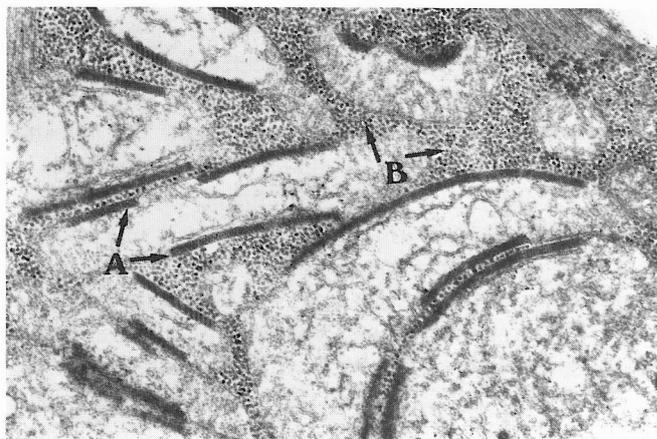


FIG. 5 – Outro aspecto em maior ampliação das mitocôndrias atípicas com matriz vacuolizadas, desorganização das cristas e inclusões paracristalinas com a membrana mitocondrial (A), envolvidas por grãos de glicogénio (B) (M.E. x 50 000).

O estudo da actividade enzimática da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) demonstrou um défice combinado dos complexos I, III e IV (Quadro I).

QUADRO I

Actividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial do doente 1

	Actividade enzimática (nmol/min/mg PNC/CS)	Controlos normais
NADH - ubiquinona reductase (Complexo I)	2.9 (20%)	7.0 - 21.0
Succinato-ubiquinona reductase (Complexo II)	16.4	12.0 - 35.0
Ubiquinol-citocromo c reductase (Complexo III)	10.9 (22%)	22.2 - 62.2
Succinato-citocromo c reductase (Complexes II + III)	2.2	2.6 - 12.0
Citocromo c oxidase (Complexo IV)	2.9 (12%)	11.5 - 34.5

As actividades enzimáticas dos complexos são referidas à da citrato sintetase (CS)

	Actividade enzimática (nmol/min/mg PNC/CS)	Controlos normais
Citrato sintetase	301.0	85.0 - 180.0

PNC - proteínas não colagénicas

	Razão das actividades enzimáticas	Controlos normais
IV / II + III	1.31	2.0 - 7.4
I / II + III	1.31	0.7 - 4.1
I / III	0.26	0.11 - 0.66
I / IV	1.00	0.3 - 0.8
III / IV	3.75	1.5 - 3.4
III / II + III	4.95	6.5 - 15.2

A análise de genética molecular revelou a presença da mutação pontual A3243G, em 88% e 70% das fibras musculares e dos leucócitos, respectivamente.

O estudo familiar (Fig. 6) foi efectuado em todos os membros da linha materna (14 familiares) em amostras de sangue, e tendo a mesma mutação sido encontrada no irmão (49%) do caso index. A avaliação clínica do irmão de 10 de idade foi normal, enquanto que a mãe com 36 anos tem tido problemas do foro psiquiátrico desde há alguns anos tem sido registadas várias tentativas de suicídio. Em ambos os casos, foi encontrada uma ligeira hiperlactacidemia (2,8 mmol/L e 2,7 mmol/L).

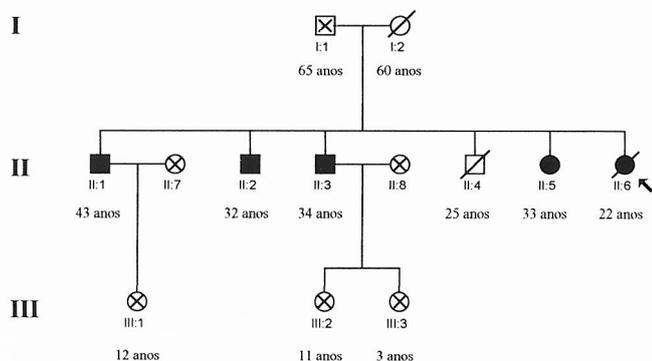


FIG. 6 – Árvore genealógica do caso 1. Os símbolos escuros indicam os indivíduos que apresentaram a mutação A3243G. O caso index está indicado por uma seta.

Casos 2 e 3

Os casos 2 e 3 são duas irmãs de raça caucasiana, filhas de um casal não consanguíneo, não aparentados com o caso 1.

Caso 2. I. C. faleceu aos 22 anos de idade devido a doença neurológica.

O probandus teve uma gestação normal, parto de termo e eutócico com peso à nascença de 2400 g (percentil 5).

No primeiro ano de vida teve um desenvolvimento psicomotor aparentemente normal. Verificou-se um atraso no início da linguagem verbal (aos 2 anos) e posteriormente registaram-se dificuldades na aprendizagem que se evidenciaram mais no período escolar.

Entre os 6 e 7 anos de idade observou-se um atraso do crescimento estatura-ponderal.

Aos 9 anos fez um electroencefalograma (EEG) que revelou actividade de fundo normal, com surtos paroxísticos generalizados de polipontas tendo sido medicada com fenobarbital sem qualquer benefício. Registaram-se

posteriormente alguns episódios compatíveis com crises generalizadas.

Aos 13 anos ocorreu a primeira crise epiléptica parcial versiva com generalização secundária; 2 meses depois, nova crise parcial motora com início na mão esquerda e generalização secundária. Desde então, registaram-se em poucos meses um aumento progressivo da frequência das crises (diárias) e o aparecimento de vômitos recorrentes. Nessa altura, recorreu pela primeira vez à Consulta de Neurologia do Hospital Distrital de Guimarães onde foi medicada com difenilhidantoína em dose terapêutica. No exame objectivo observou-se uma adolescente com lentificação ideativa, de baixa estatura (120 cm), baixo peso corporal (31 Kg), com dismorfia significativa, cifoscoliose marcada e hirsutismo (Fig. 7) e no RX da coluna vertebral visualizaram-se vértebras baixas. Perante este fenótipo clínico foram excluídas as mucopolissacaridoses.

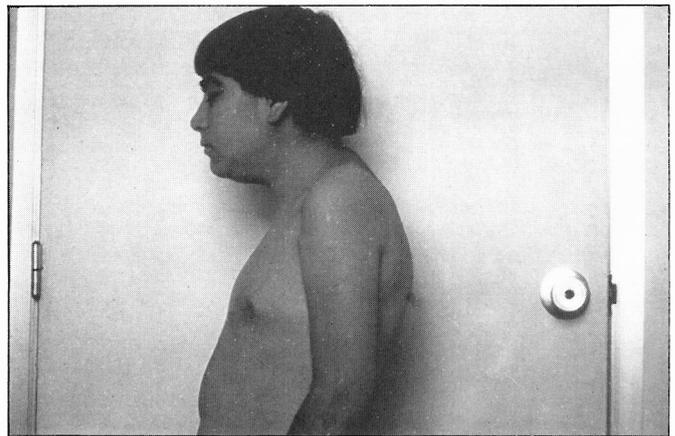


FIG. 7 – Representa a doente 2, com dismorfia significativa, cifoscoliose e hirsutismo.

Registou-se um sopro cardíaco grau II em VI no apex e foco aórtico; não se detectaram arritmias e a frequência cardíaca e tensão arteriais eram normais.

A fundoscopia ocular era normal.

À excepção de uma assimetria dos reflexos miotáticos que se encontravam globalmente diminuídos, mas mais vivos à esquerda, o exame neurológico, à data da primeira observação, era normal.

Fez um TAC cerebral que evidenciou uma lesão isquémica parieto-occipital direita e vermis atrófico e um novo EEG que registou sofrimento cerebral generalizado e actividade paroxística fronto-temporal direita.

Progressivamente desenvolveu deterioração mental, ataxia, cansaço fácil, fraqueza muscular generalizada e surdez neuro-sensorial; mantendo crises epilépticas parciais motoras com generalização secundária e crises mioclónicas refractárias à terapêutica.

O padrão de ecocardiograma em modo-M e bidimensional foi compatível com uma cardiomiopatia hipertrofica.

Os potenciais evocados auditivos registaram uma surdez neurosensorial no ouvido esquerdo, não sendo possível a estimulação do ouvido direito.

Foi efectuada uma biópsia neuromuscular incidindo sobre o nervo musculocutâneo e o músculo curto peroneal lateral. O estudo do nervo sensitivo revelou a existência de muito discretas lesões de neuropatia axonal. O músculo apresentava discretos sinais de atrofia muscular neurogênica e ocasionais RRFs. O exame de cortes ultra finos em Microscopia Electrónica destas fibras mostrou que apresentavam grandes aglomerados de mitocôndrias distróficas, quer com distorção das suas cristas (que se apresentavam frequentemente com disposição paralela), quer apresentando inclusões paracristalinas. Em nenhum dos exames foi evidenciada doença de sobrecarga (nomeadamente por mucopolissacarídeos).

O estudo genético demonstrou a presença da mutação pontual A3243G em 79% das moléculas do mtDNA das fibras musculares esqueléticas.

Um ano antes de falecer, estava acamada com marcha possível se amparada bilateralmente, apática, sem qualquer reacção aos estímulos sonoros, não comunicando verbal ou gestualmente, com uma tetraparésia atáxica e flácida e arreflexia miotática generalizada.

Fez novo TAC cerebral que apresentava acentuada atrofia cortico-subcortical supra e infratentorial, com calcificações bilaterais do estriado e enfarte parieto-occipital direito.

Caso 3. C. C. irmã mais velha da doente anterior, apresenta pequena estatura (1,47m) e um atraso mental ligeiro. Aos 28 anos efectuou uma biópsia muscular atendendo aos resultados histopatológicos encontrados na irmã (nessa altura ainda se desconhecia a mutação presente). Os estudos histoquímico e histoenzimático da biópsia revelaram presença de frequentes RRFs e de fibras COX negativas. A análise molecular revelou a mutação MELAS³²⁴³ em 69% e 20% do mtDNA da biópsia muscular e dos leucócitos, respectivamente. Esta doente, actualmente com 33 anos, sofre de diabetes mellitus tipo II e apresenta problemas auditivos.

Na história familiar (Fig. 8) consta o falecimento da mãe aos 60 anos com alguns sinais de deterioração mental e a morte súbita de um irmão aos 25 anos, com antecedentes de gestação e parto normais, um bom desenvolvimento psicomotor e adequado aproveitamento escolar tendo desenvolvido mais tarde um quadro de alterações de comportamento, visão e audição, tendo-lhe sido diagnosticado um tumor cerebral (provavelmente astrocitoma). Três anos após a recessão neurocirúrgica, o TAC cerebral não mostrou recidiva do tumor mas eviden-

ciou um enfarte hemisférico esquerdo por oclusão da carótida esquerda. Apresentava epilepsia com traçados epileptiformes.

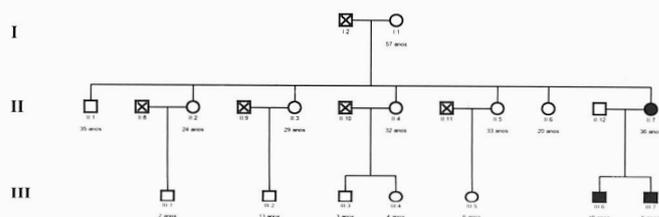


FIG. 8 – Árvore genealógica dos casos 2 e 3. Os símbolos escuros indicam os indivíduos que apresentaram a mutação A3243G em quantidade mensurável. Os casos index estão indicados por setas.

O estudo genético familiar foi efectuada através de amostras de sangue dos três irmãos e a mutação MELAS³²⁴³ foi encontrada em 13% das moléculas de mtDNA leucocitário num irmão com problemas do foro psiquiátrico, e em quantidades vestigiais nos dois irmãos clinicamente assintomáticos.

Métodos

A determinação espectrofotométrica das actividades enzimáticas dos complexos da cadeia respiratória e da citrato sintetase foi efectuada sobre homogeneizado de músculo esquelético congelado, conforme técnicas já descritas⁽¹⁷⁾. O DNA genómico foi extraído segundo os métodos tradicionais⁽¹⁸⁾, e os doentes rastreados para a mutação mais prevalente do mtDNA⁽¹⁹⁾. Aproximadamente 1µg de DNA foi submetido a uma amplificação através da *polymerase chain reaction* (PCR) de um fragmento de 269 pares de bases de acordo com o seguinte programa (1 min. 94°C, 1 min. 55°C, 0,75 min. 72°C; 25 ciclos) num termociclador *Perkin-Elmer*. Foram utilizados os oligonucleóticos iniciadores seguintes (5'-3'): nas posições 3116-3134 da cadeia leve e 3353-3333 da cadeia pesada (de acordo com a sequência de *Cambridge*)⁽²⁰⁾. Um ciclo extra foi efectuada para evitar a formação de moléculas de heteroduplex (2 min. 94°C, 1 min 55°C, 15 min. 72°C) após a adição de 10µCi de [α ³²P]-dATP, 100pmol de cada *primer* e 2,5U de *Taq polimerase*. O fragmento produzido através da reacção de PCR foi digerido, a 37° C, com a enzima de restrição (endonuclease)

HaeIII durante duas horas. O produto da digestão foi submetido a uma electroforese de poli-acrilamida não desnaturante a 12% e exposto a uma película fotográfica à temperatura ambiente durante 18 horas. Para calcular a quantidade de mtDNA mutado a película foi submetida a uma leitura por densitometria (Phosphor-Imager, Biorad).

A mutação A3243G foi confirmada através de sequenciação directa do produto de PCR, num sequenciador automático *Perkin-Elmer Abi Prisma*, sem que nenhum polimorfismo adicional tenha sido encontrado nesta região do mtDNA que pudesse explicar a heterogeneidade clínica observada nestes doentes. A mutação foi identificada em heteroplasmia nos 6 casos ⁽²¹⁾.

Resultados e discussão

No caso 1, os estudos bioquímicos revelaram défices severos nos complexos I (20% do normal) e IV (12%) e parcial no III (22%) com alteração das respectivas razões enquanto a citrato sintetase estava duas vezes aumentada em relação ao valor médio dos controlos (Quadro I). A análise genética excluiu deleções de grandes dimensões no mtDNA mas revelou a presença da mutação A3243G numa grande percentagem das moléculas de mtDNA no músculo e leucócitos do probandus. Devido à hereditariedade materna normalmente associada às mutações pontuais, esta mutação foi pesquisada em 14 membros da linha materna. Contudo, só foi identificada no sangue do irmão e da mãe (único tecido disponível nesta investigação). O caso index tem uma apresentação clínica atípica de MELAS, sendo a presença de cardiomiopatia dilatada o dado mais relevante ⁽²²⁾. Dos doentes com MELAS referidos na literatura, só cerca de 20%, apresentavam cardiomiopatia a qual na maior parte dos casos era hipertrofica (como no nosso caso 2). A doença afectiva da mãe pode também ser considerada uma apresentação atípica ⁽²³⁾ deste síndrome, enquanto o irmão permanece assintomático. É provável que a mutação tenha aparecido *de novo* na mãe pois não foi detectada na geração anterior, nem em nenhum dos irmãos.

Nos casos 2 e 3 não foi possível efectuar a determinação da actividade dos complexos da cadeia respiratória em virtude de não haver material de biópsia, em quantidade suficiente. O caso 2 apresenta uma diversidade de sinais e sintomas neurológicos que sugere uma sobreposição dos síndromes MELAS/MERRF ⁽²⁴⁾. A doença teve um início precoce e insidioso, manifestado essencialmente por uma dificuldade na aprendizagem e apatia. Mais tarde, tornou-se exuberante com atraso de crescimento estatura-ponderal, e presença de epilepsia com crises parciais motoras de generalização secundária não controláveis. O aparecimento de vómitos, ataxia, tetrapa-

résia, hipoacusia progressivamente agravadas, evidenciam lesões de enfarte cerebral. Estas características podem ser imputadas a um quadro de MELAS no entanto, as crises mioclónicas manifestadas posteriormente já estão mais associadas ao de MERRF.

Os nossos dados são semelhantes aos de outros autores, quando estes procederam à investigação familiar de doentes com quadro de MELAS ⁽²⁵⁾. O estudo genético familiar efectuado, revelou dois casos em que a quantidade de mtDNA mutado era vestigial. Há no entanto que salvaguardar que o sangue foi o único tecido investigado, e que possivelmente outros tecidos (como por exemplo o músculo) poderão ser portadores desta mutação em maior quantidade. Encontrou-se ainda mais um irmão afectado de 31 anos, com problemas psiquiátricos desde os 19. É provável que o irmão falecido também fosse portador da mutação MELAS³²⁴³ tendo em consideração os dados clínicos sugestivos e o diagnóstico de astrocitoma ⁽²⁶⁾ associado a um enfarte e a epilepsia.

Atendendo ao carácter de hereditariedade materna associado a esta mutação pontual, a mãe dos casos 2 e 3 que apresentou uma deterioração mental nos últimos anos, seria possivelmente heteroplásmica para a mesma mutação.

Nos casos 1 e 2 o início da doença verificou-se na infância e só no caso 2 foi detectada a presença de episódios «stroke-like» que é considerado um marcador clínico de MELAS.

A presença de RRFs evidencia uma proliferação anormal de mitocôndrias, que nos três casos descritos existiam quer em quantidade moderada como no caso 2, quer em grande quantidade, mesmo no doente mais novo, o que é raro, pois a presença daquelas fibras depende do estadió da doença e o curto tempo de evolução desta, normalmente não permite que o erro metabólico produza alterações com tradução morfológica identificável. Nas PEO, as fibras RRFs são Cox negativas enquanto que nos doentes com MELAS, aquelas são na maioria dos casos Cox positivas.

Nos casos descritos, e embora nenhum deles apresentasse um quadro típico de MELAS, encontramos uma correlação entre a quantidade de mtDNA mutado e a idade de início da doença.

A análise de genética molecular do mtDNA dos membros da linha materna destes probandus, demonstrou que esta mutação pode estar presente também, em indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos. A presença de mtDNA mutado não é por conseguinte, suficiente para originar uma disfunção mitocondrial, tem que exceder um determinado limite (limiar de expressão) para ter expressão fenotípica.

As doenças do metabolismo energético cardíaco, como os défices da β -oxidação e os défices da cadeia respira-

tória mitocondrial devem ser equacionadas na investigação das cardiomiopatias «idiopáticas» quer hipertróficas quer dilatadas (27).

Conclusões

Devido à inexistência de um tratamento adequado eficaz, a vigilância de doentes de risco e um aconselhamento genético adequado são as únicas alternativas que poderemos oferecer a estas famílias. Efectivamente, atendendo à heteroplasmia, à segregação mitótica do mtDNA e à hereditariedade materna, o risco de doença é difícil de calcular.

Os doentes descritos ilustram diferentes apresentações atípicas de MELAS: cardiomiopatias familiares, perturbações psiquiátricas e diabetes mellitus, pelo que propomos que a análise do mtDNA seja incluída como diagnóstico diferencial destas situações.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos familiares dos doentes, a colaboração prestada neste estudo, assim como à Célia Nogueira, técnica do IGM pela execução dos estudos enzimáticos.

BIBLIOGRAFIA

- Hammans SR, Morgan-Hughes JA. Mitochondrial myopathies: clinical features, investigation, treatment and genetic counselling. In: Schapira AHV, DiMauro S, editors. *Mitochondrial disorders in neurology*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994: 49-74.
- Vilarinho L, Cardoso ML, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das citopatias mitocondriais: Parte I. *Arquivos de Medicina* 1997; 11(2): 75-81.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-19.
- Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira AHV, Toscano A, Clark JB, et al. Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 1989; 26: 699-708.
- Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989; 320: 1293-1299.
- Vilarinho L, Cardoso ML, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das citopatias mitocondriais: Parte II – Revisão de 30 doentes. *Arquivos de Medicina* 1997; 11(3): 160-166.
- Morgan-Hughes. Mitochondrial myopathies. In Engel & Franzini-Armstrong, eds. *Myology*. McGraw-Hill, New York 1997; 1610-1660.
- DiMauro S, Moraes CT: Mitochondrial Encephalomyopathies. *Arch Neurol* 1993; 50: 1197-1208.
- Goto Y, Nonaka I, & Horal S: A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348: 651-653.
- Kobayashi Y, Momo MY, Tominaga K, 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: 816-822.
- Goto Y. Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle and Nerve* 1992; 3: 107-112.
- Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Silvestri G, Hirano M, Simonetti S, Angelini C, Donati MA, Garcia C, Martinuzzi A, Mosewich R, Servidei S, Zammarchi E, Bonilla E, DeVivo DC, Rowland LP, Schon EA, DiMauro S. MELAS: Clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Annals of Neurology* 1992; 31(4): 391-397.
- Pavakis SG, Philips PC, DiMauro S, et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes: A distinctive clinical syndrome. *Ann Neurol* 1984; 9: 481-488.
- Hirano M, Ricci E, Koenigsberger MR, Defendini R, Pavlakis SG, DeVivo DC, DiMauro S, Rowland LP. MELAS: An original case and clinical criteria for diagnosis: *Neuromusc Disord* 1992; 2(2): 125-135.
- Hirano M, Pavlakis SG. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): current concepts. *J Child Neurol* 1994; 9: 4-13.
- Vilarinho L, Maia C, Coelho T, Coutinho P, Santorelli FM. Heterogeneous presentation in Leigh syndrome. *J Inher Metab Dis* 1997; 20: 704-705.
- DiMauro S, Servidei S, Zeviani M, DiRocco M, DeVivo DC, DiDonato S, Uziel G, Berry K, Hoganson G, Johnsen SD, Johnson PC. Cytochrome c oxidase in Leigh syndrome. *Ann Neurol* 1987; 22: 498-506.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns – Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346.
- Hammans SR, Sweeney MG, Hanna MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE. The mitochondrial DNA transfer RNA^{Leu(UUR)} A → G mutation: A clinical and genetic study. *Brain* 1995; 118: 721-734.
- Anderson S, Bankier AT, Barrel BG et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465.
- Macmillan C, Lach B, Shoubridge EA. Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA^{Leu[3243]}) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: The role of mitotic segregation. *Neurology* 1993; 43: 1586-1590.
- Vilarinho L, Santorelli FM, Rosas MJ, Tavares C, Melo-Pires M, DiMauro S. The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy. *J Med Genet* 1997; 34(7): 607-609.
- Shanske AL, Shanske S, Silvestri G, Tanji K, Werthein D, Lipper S. MELAS point mutation with unusual clinical presentation. *Neuromusc* 1993; 3(3): 191-193.
- Zeviani M, Muntuoni F, Savarese N, Serra G, Tiranti V, Carrara F, Mariotti C, DiDonato S. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA^{Lys} gen. *Eur J Hum Genet* 1993; 1: 80-87.
- Remes AM, Majamaa K, Herva R, Hassinen IE. Adult-onset diabetes mellitus and neurosensory hearing loss in maternal relatives of MELAS patients in a family with the tRNA^{Leu(UUR)} mutation. *Neurology* 1993; 43: 1015-1020.
- Sparaco M, Bonilla E, DiMauro S, Powers J. Neuropathology of mitochondrial encephalomyopathies due to mitochondrial DNA defects. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52(1): 1-10.
- Sperl W. Cardiomyopathy and mitochondrial defects of oxidative energy metabolism. In: Böhles H, Hofstetter R, Sewell AC, eds. *Metabolic Cardiomyopathy*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 1995: 99-114.