

Luísa Maria de Abreu Freire Diogo Matos

**Caracterização Clínica e Bioquímica
das
Doenças Mitocondriais na Criança**

**Contribuição para o Estudo Epidemiológico
na Região Centro de Portugal**



Universidade de Coimbra

2009

1 - RESUMO

Neste trabalho analisou-se a clínica, o diagnóstico, o prognóstico e a epidemiologia das doenças da cadeia respiratória mitocondrial (doença mitocondrial) em crianças na Região Centro de Portugal, uma década após o início do diagnóstico sistemático destas doenças no Hospital Pediátrico de Coimbra, em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra. O principal objectivo foi retirar, da nossa e da experiência de outros grupos, os ensinamentos necessários a uma melhor orientação futura destes doentes.

O objecto do estudo é o grupo das 200 crianças cuja suspeita de doença mitocondrial foi investigada com recurso à análise de amostras de músculo esquelético (193 casos), fígado (41) e/ou miocárdio (11), no período de 1997 a 2006 (10 anos).

As manifestações clínicas tiveram início no primeiro ano de vida em 71% dos casos (no período neonatal em 35%). Em 153 crianças a apresentação foi neurológica e/ou muscular. Cento e setenta e cinco doentes evoluíram com clínica do sistema nervoso central, 44 dos quais com doença multissistémica. A gravidade clínica traduziu-se em elevada mortalidade (27%), em grande percentagem de casos com agravamento clínico (13%) e em investigação etiológica alargada na maior parte dos casos.

Os doentes foram classificados segundo os critérios clínico-laboratoriais de Bernier para o diagnóstico de doença mitocondrial em quatro níveis de probabilidade diagnóstica: definida (95 casos), provável (77), possível (10) e improvável (18).

O diagnóstico de doença mitocondrial foi baseado na presença de uma síndrome (18 casos, oito com síndrome de Leigh), de alterações do DNA mitocondrial e/ou nuclear (nove), de fibras musculares vermelhas rotas (dois) e sobretudo na identificação de défice enzimático *major* da cadeia respiratória (91). A estes critérios maiores, associou-se uma grande diversidade de critérios menores clínicos, metabólicos, enzimáticos, histológicos e genéticos. Os défices enzimáticos dos complexos IV (89 doentes) e I (68) foram os mais frequentes, tal como tem sido referido em outras séries.

Em 84 doentes (42%) não se obteve um diagnóstico etiológico. Setenta e oito crianças (39%) tiveram o diagnóstico de doença mitocondrial. Em 38 casos (19%) chegou-se a um outro diagnóstico etiológico, destacando-se o grupo das outras doenças metabólicas e o das infecções virais. Dezassete destas 38 crianças cumpriam critérios de doença mitocondrial definida, que foi considerada secundária.

Confirmou-se a grande variabilidade e a não especificidade clínica das doenças mitocondriais na criança, através da semelhança entre os vários grupos de diagnóstico na nossa série.

A incidência e prevalência destas patologias são estimadas quase sempre em estudos retrospectivos como este. Variam amplamente com a população em causa e o modo de selecção dos doentes, a extensão da investigação etiológica e os critérios de diagnóstico

aplicados. A incidência de doença mitocondrial com manifestação clínica na primeira década de vida, na Região Centro, foi estimada em 1/6500 nado-vivos, valor elevado em comparação com outras séries pediátricas. Em 2006, a prevalência pontual destas doenças nesta Região era de 1/ 18500 habitantes com menos de 10 anos de idade, o que está de acordo com a sua elevada mortalidade na infância.

A abordagem diagnóstica das doenças mitocondriais é complexa, não existindo uma prova simples que as confirme ou exclua. O aparente peso excessivo dos défices enzimáticos da cadeia respiratória no diagnóstico e a pobreza relativa de alterações histológicas nos nossos doentes levou à análise detalhada dos estudos mitocondriais realizados (quer os inespecíficos, como os níveis de lactato, quer os específicos como a actividade enzimática). Assim, reclassificou-se os doentes aplicando a escala de Nijmegen, após exclusão dos dados enzimáticos e moleculares. Muito mais casos atingiram deste modo um nível superior de probabilidade diagnóstica, o que atesta a validade dos argumentos da suspeita diagnóstica e corrobora os resultados do estudo enzimático neste grupo de crianças.

O diagnóstico dos nossos doentes baseou-se na clínica e no estudo bioquímico da cadeia respiratória, como seria de esperar numa população pediátrica, em que a maioria dos casos se deve a alterações do DNA nuclear. Ao contrário da investigação do DNA mitocondrial, realizada amplamente nos nossos doentes com uma taxa de diagnóstico molecular muito baixa, o estudo do DNA nuclear, efectuado em poucos casos, foi frequentemente positivo. É necessário maior investimento nos estudos moleculares, uma vez que as alterações mitocondriais, tanto enzimáticas como morfológicas, são muitas vezes secundárias.

Elaborou-se um fluxograma diagnóstico que correlaciona a clínica, as alterações enzimáticas da cadeia respiratória, os achados histológicos e as alterações patogénicas do DNA mitocondrial e nuclear.

Com base nesta análise e nos recursos disponíveis, propõe-se uma escala diagnóstica, inspirada na de Nijmegen, a aplicar no Hospital Pediátrico. Esta baseia-se numa tabela de dupla entrada com os critérios clínico-laboratoriais gerais de Nijmegen e os resultados do estudo enzimático da cadeia respiratória (ambos escalonados em improvável, possível, provável e definido). A escala proposta é mais restritiva em termos de probabilidade de diagnóstico final de doença mitocondrial para o caso individual do que a utilizada neste trabalho, reforçando-se a importância da clínica e dos estudos bioquímicos e histológicos na orientação da investigação molecular, de acordo com o fluxograma diagnóstico referido.

Conclui-se pela necessidade do reforço da colaboração entre os grupos que investigam estas doenças, no sentido de estabelecer critérios de diagnóstico, definição e classificação uniformes. Só definindo a sua prevalência e história natural é possível organizar adequadamente o apoio aos doentes e famílias.

SUMMARY

In this study a review of the clinical presentation, diagnosis, prognosis and epidemiological data of childhood mitochondrial respiratory chain disorders (mitochondrial disorders) in the Central Region of Portugal is presented.

This analysis was carried out one decade after the introduction of this diagnosis in the Paediatric Hospital of Coimbra, in cooperation with the Laboratory of Biochemical Genetics at the Centre for Neurosciences and Cell Biology of the University of Coimbra.

The main objective is to improve clinical evaluation and follow-up of patients, based on our experience and that of other groups.

For this purpose, we reviewed the clinical files of all 200 children whose investigation for a mitochondrial disorder included the analysis of muscle (193 patients), liver (41) and/or myocardium (11) samples, over a period of 10 years (1997 to 2006).

Thirty five percent of the patients presented the disorder in the neonatal period and 71% in the first year of life. At presentation, 153 children had neurologic and/or muscular symptoms. Throughout evolution, central nervous system dysfunction affected 175 children, frequently in the context of multisystemic involvement (44 patients). Clinical severity was revealed by the high mortality (27%) and disease progression (13%) rates and by the extended etiological investigation performed in most cases.

Patients were classified, according to Bernier criteria for mitochondrial disease in children, in four diagnostic probability groups: definite (95 cases), probable (77) possible (10) and unlikely (18). Diagnostic classification was based on the identification of a known mitochondrial syndrome (18 patients, eight with Leigh syndrome), pathogenic mitochondrial DNA and/or nuclear DNA mutations (nine), ragged red fibres (two) and a *major* respiratory chain enzymatic defect (91). Other *minor* clinical, metabolic, enzymatic, histopathological and genetic criteria also contributed to the diagnosis of these patients. Respiratory chain enzymatic complexes IV (89 patients) and I (68) were the most frequently affected, as in other series.

In 84 patients (42%), an etiological diagnosis was not achieved. A mitochondrial respiratory chain disorder was established in 78 children (39%). A different diagnosis was found in 38 cases, other metabolic disorders and viral infections being the most commonly identified. Seventeen of these patients fulfilled criteria for definite mitochondrial disease and were classified as secondary.

We have corroborated the great clinical variability and non-specific features of mitochondrial diseases in children through the similarity among the diverse diagnostic groups in our series.

Mitochondrial disease incidence and prevalence are usually estimated through retrospective studies like the present one. Figures vary a lot, depending on the

population under study and patient selection, investigation thoroughness, and diagnostic criteria. Incidence of mitochondrial disease in children under 10 years of age in the Central Region of Portugal was 1/ 6500 newborns, which is high compared to other paediatric series. In 2006 the prevalence in this region was 1/ 18500 children under 10 years of age, which confirms the high mortality caused by these disorders in childhood.

The diagnostic approach for mitochondrial disorders is complex, since there is no simple test to confirm or exclude them. The apparent over-representation of respiratory chain enzymatic deficits and the relative paucity of histological abnormalities in our patients led us to analyse the mitochondrial studies performed. The patients were reclassified using the Nijmegen scale, after exclusion of enzymatic and molecular genetic data. With this new classification (the clinical and laboratory Nijmegen general criteria), a higher level of diagnostic certainty was obtained, confirming the value of diagnostic suspicion and respiratory chain enzymatic evaluation in this group of children.

The diagnosis in our patients was mostly based on the clinical and respiratory chain biochemical studies, as would be expected in a paediatric population, in whom most mitochondrial disorders are caused by mutations in the nuclear DNA. These were investigated in only a few patients in our series and frequently yielded positive findings. As expected, pathogenic mutations in mitochondrial DNA, although broadly investigated, were rarely found.

Since mitochondrial abnormalities, both enzymatic and morphological, are frequently secondary to other disease states, it is crucial to carry out in depth molecular genetic studies. A diagnostic chart, which emphasises the correlation of clinical, histological and enzymatic data with pathogenic mitochondrial and nuclear abnormalities, is presented in this work.

Taking into account the present study and our resources, a new diagnostic scale based on the Nijmegen group classification, to be used in our Hospital, is proposed. It consists of two groups of data (clinical, metabolic/ imaging and histopathology versus respiratory chain enzymatic activity), both classified as definite, probable, possible and unlikely. The combination of general and enzymatic criteria allows a final patient diagnosis to be made. This new classification, being more restrictive than the one we employed in the present study, strengthens the need to use the entire patient's data to decide on the appropriate molecular genetic studies, according to the proposed diagnostic chart.

We conclude that there is a great need to reinforce collaboration among the groups investigating mitochondrial disorders, in order to establish uniform diagnostic criteria, a definition and classification. Adequate support to patients and families will not be possible unless the prevalence and natural history of these disorders are well defined.

AGRADECIMENTO

À minha família, pelo amor e apoio incondicional que sempre me tem dado nos projectos pessoais e profissionais. Um agradecimento especial ao Gabriel, meu companheiro de sempre, às minhas filhas, João e Bia, aos meus genros, aos meus pais e ao Bernardo, meu *pai adoptado*. Agradeço também aos meus irmãos, e especialmente à Lívia, pelo incentivo a que não desistisse deste projecto! Aos meus netos, Matilde, Rodrigo e Pedro, dedico em particular este trabalho, para que nunca voltem costas aos desafios.

À Professora Doutora Catarina Oliveira e ao Professor Doutor Carmona da Mota, meus orientadores nesta tese (embora agora, não oficialmente), meus mestres, sob cuja direcção tive o privilégio de trabalhar ao longo de grande parte da minha vida profissional, pelo seu exemplo pessoal e profissional, os seus conselhos sempre pertinentes, a criação da oportunidade e incentivo à realização deste trabalho, a orientação e a revisão crítica do texto.

À Manuela Grazina e restante equipa do Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra, pela implementação e realização dos estudos mitocondriais dos nossos doentes, pelo grande esforço profissional e pessoal colocado no avanço local das técnicas de investigação e diagnóstico das doenças da cadeia respiratória mitocondrial, pela sua colaboração incondicional e pela sua amizade.

À Paula Garcia, a quem devo uma boa parte do trabalho clínico aqui apresentado, uma palavra de especial apreço. Tenho podido contar sempre com a sua disponibilidade e espírito de equipa, a sua grande qualidade técnica e profissional e sagacidade, condições que muito têm feito progredir a Unidade de Doenças Metabólicas. Agradeço-lhe a frontalidade e a amizade, que muito prezo. Aos restantes elementos da Unidade de Doenças Metabólicas, à Ana, à Marta e à Fidjy, pela sua competência, apoio e amizade. À Fidjy em especial pela revisão das referências bibliográficas deste trabalho.

À Isabel Tavares de Almeida, pela sua colaboração de sempre no estudo laboratorial dos nossos doentes, o empenhamento absoluto no avanço da *causa metabólica*, nomeadamente na direcção da Sociedade Portuguesa de Doenças Metabólicas, o seu exemplo pessoal e profissional e a sua amizade, bem patenteada no apoio e interesse colocados na paciente revisão crítica do texto final desta tese.

À Laura Vilarinho, responsável pelo Serviço Nacional de Rastreios, pela sua colaboração de sempre no estudo laboratorial dos nossos doentes e em particular pela realização dos estudos de DNA nuclear dos doentes revistos nesta tese.

A todos os funcionários e a todos os meus colegas do Centro de Desenvolvimento, em especial ao Boavida Fernandes pela disponibilidade em ajudar no Serviço de Urgência sempre que precisei. À Guiomar Oliveira pela colaboração especial no estudo dos doentes com autismo e doença mitocondrial. A todos os Neuropediatras (Dr Luís Borges, Isabel Fineza, Conceição Robalo, Olavo Gonçalves e Mónica Vasconcelos) com quem que partilhámos o seguimento clínico de muitos dos doentes desta série. À Conceição Robalo e equipa do Laboratório de Electroencefalografia, em particular, pela ajuda na revisão dos casos com epilepsia. Uma palavra especial para o Dr Luís Borges pelo incentivo e carinho com que sempre me distinguiu.

Aos colegas do Serviço Genética do Hospital Pediátrico pela colaboração no diagnóstico de alguns dos doentes desta série e especificamente ao Sérgio Sousa pela ajuda na revisão do texto sobre os resultados dos estudos citogenéticos.

Aos colegas e restante pessoal da Cirurgia, Radiologia e Anestesia pela realização das biópsias musculares e hepáticas dos doentes.

A todos os meus colegas e enfermeiros do Hospital Pediátrico, nomeadamente da Unidade de Cuidados Intensivos e da Enfermaria de Medicina, incluindo a Unidade de Hepatologia, que seguiram e trataram muitos dos doentes revistos neste estudo e connosco debateram os seus diagnósticos e orientações terapêuticas, bem como aos respectivos médicos assistentes de outros Serviços de Saúde, nomeadamente das Maternidades de Coimbra.

À Maria do Carmo Macário do Serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, que segue os doentes adultos com doenças da cadeia respiratória mitocondrial ou sua suspeita, incluindo os desta série. As suas qualidades pessoais e profissionais e o seu interesse pelas doenças neurometabólicas, permitindo partilhar experiências e aprender em equipa, têm sido um factor importante para o avanço do conhecimento das doenças mitocondriais entre nós.

Ao Miguel Cordeiro e aos Neurorradiologistas do nosso Hospital pela ajuda na revisão dos achados neurorradiológicos. Ao Miguel em particular pela sistematização e interpretação dos achados na série de doentes em estudo

À Teresa Proença e sua equipa do laboratório de Neuroquímica dos HUC pela realização dos estudos *redox* dos nossos doentes.

À Olinda Rebelo e ao Dr António Guimarães dos Serviços de Neuropatologia dos HUC e do Hospital de Santo António do Porto, respectivamente e ao Prof. Juan Cuevas do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Santiago de Compostela pelos estudos anatomo-patológicos do músculo. Aos colegas do Serviço de Anatomia Patológica dos HUC pelos estudos em fígado e miocárdio.

À Isabel Carreira e sua equipa do Laboratório de Citogenética da Faculdade de Medicina de Coimbra, pela colaboração nos estudos citogenéticos e na cultura de fibroblastos de muitos dos nossos doentes.

À Margarida Alte da Veiga pela preciosa ajuda na análise estatística dos dados deste trabalho. Aos funcionários dos laboratórios de análises clínicas do nosso Hospital, do Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia de Lisboa e do Instituto de Genética Médica do Porto e a todos os laboratórios nacionais e estrangeiros que connosco colaboraram na realização de investigação etiológica dos nossos doentes.

Aos funcionários do Arquivo do nosso Hospital, que foram incansáveis no levantamento de todos os processos clínicos para revisão, dando mostra de especial consideração e carinho.

À D. Catarina Lopes e à D. Elvira Rafael (Biblioteca dos Hospitais da Universidade de Coimbra) e à D. Edite Garcia (Biblioteca do Hospital Pediátrico de Coimbra) pela sempre pronta e valiosa ajuda na pesquisa bibliográfica.

Aos meus colegas do Serviço de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pelo apoio e *vicariância* nas minhas funções de Assistente, sempre que deles necessitei e também à D. Rosa Cardoso pela sua disponibilidade e apoio.

Por último, mas não menos importante, aos pacientes e suas famílias pela confiança e pela colaboração na procura, tantas vezes frustrada, da causa da doença, quase sempre sem que se vislumbrasse um tratamento específico.

Um *bem haja!* a todos os que de algum modo colaboraram na concretização deste projecto.

PUBLICAÇÕES

Parte dos resultados apresentados nesta dissertação foi incluído nas seguintes publicações:

Sob a forma de artigo original:

L Diogo, H Drago, A Fernandes, G Carvalho, J Canha, HC Mota, T Proença, C.Oliveira. **Avaliação do estado redox plasmático na criança.** Acta Ped Port, 1999; 2 (30): 129-133.

Oliveira G, Diogo L, Grazina M, Garcia P, Ataíde A, Marques C, Miguel T, Borges L, Vicente AM, Oliveira CR. **Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a population-based study.** Dev Med Child Neurol. 2005; 47(3):185-9.

Correia C, Coutinho AM, Diogo L, Grazina M, Marques C, Miguel T, Ataíde A, Almeida J, Borges L, Oliveira C, Oliveira G, Vicente AM. **Brief report: High frequency of biochemical markers for mitochondrial dysfunction in autism: no association with the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene.** J Autism Dev Disord. 2006;36:1137-40.

Grazina MM, Diogo LM, Garcia PC, Silva ED, Garcia TD, Robalo CB, Oliveira CR. **Atypical presentation of Leber's hereditary optic neuropathy associated to mtDNA 11778G>A point mutation - A case report.** Eur J Paediatr Neurol. 2007; 11(2):115-8.

Diogo L, Grazina M, Garcia P, Rebelo O, Veiga MA, Cuevas J, Vilarinho L, de Almeida IT, Oliveira CR. **Pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in the Centro region of Portugal.** Pediatr Neurol. 2009; 40(5):351-6.

Cordeiro M., Scaglia F., Lopes da Silva S., Garcia P., Grazina M., Moura C., Diogo L. **The Brain-Heart Connection in Mitochondrial Respiratory Chain Diseases** The Neuroradiol J. 2009; 22: 558-563.

Diogo L, Cordeiro M, Garcia P, Grazina M, Rito S, Oliveira CR, Veiga MA, Garcia T. **Brain Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders in Children.** Pediatr Neurol. (in press)

Sob a forma de resumo:

Diogo L, Grazina MMM, Garcia P, Fernandes A, Oliveira LM, Almeida I, Vilarinho L, Oliveira CR (1998) **Extra Neuromuscular Presentation of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders** - Analysis of Six Portuguese Patients, J Inher Metab Dis, 21 (S2): 84.

Grazina M, Diogo L, Fernandes A, Oliveira L M Godinho, A Cabral, O Rebelo, I Fineza, C R Oliveira.(1999). **Mitochondrial myopathy and merosin-positive dystrophy.** J Inher Metab Dis 22 (S1): 39.

Grazina M, Oliveira LM, Diogo L, Fernandes AIP, Godinho M, Carreira IM, Macário MC, Rebelo O, Santos P, Oliveira CR. (2000). **Genotypical and phenotypical variability of mitochondrial DNA deletions: report of six cases.** J Inher Metab Dis 23 (S1): 145.

Grazina M, Godinho M, Simões M, Carreira IM, Diogo L, Fernandes A, Oliveira CR. (2001). **Biochemical approach to mitochondrial cytopathies in centre Portugal: results of three years.** J Inher Metab Dis 24 (S1): 78.

Almeida D, Diogo L, Garcia P, Grazina M, Silva E, Tavares Almeida I, Oliveira CR. (2004). **From migraine to mitochondrial respiratory chain disease.** J Inher Metab Dis 27(S1):114.

Garcia P, Duarte C, Grazina M, Oliva M, Robalo C, Oliveira C, Diogo L. (2005). **Acute fatty liver of pregnancy and mitochondrial disease in the foetus.** J Inher Metab Dis 28(S1): 127

Diogo L, Garcia P, Grazina M, Cabral A, Robalo C, Oliveira CR. (2005). **Brain Calcifications and mitochondrial disease—clinical report.** J Inher Metab Dis 28(S1): 130.

Estevinho A, Oliveira S, Pratas J, Simões M, Mendes C, Santos MJ, Oliveira M, Diogo L, Macário C, Oliveira CR, Grazina M. (2008). **Mitochondrial cardiomyopathies: biochemical and genetic heterogeneity.** J Inher Metab Dis 31 (S1):52.

Silva S, Robalo C, Garcia P, Grazina M, Oliveira CR, Diogo L. (2008). **West syndrome and mitochondrial dysfunction.** J Inher Metab Dis 31 (S1):52.

Neves N, Garcia P, Proença T, Baldeiras I, Grazina M, Vilarinho L, Oliveira CR, Diogo L. (2008). **Oxidative stress in childhood mitochondrial respiratory disease- 20 cases.** J Inher Metab Dis 31 (S1):57.

Grazina M, Pratas J, Simões M, Mendes C, Oliveira S, Oliveira M, Macário C, Diogo L, Garcia P, Oliveira CR. (2008). **Ocular involvement in mitochondrial disease: biochemical and genetic diversity outline in central Portugal.** J Inher Metab Dis 31 (S1):59.

Castelo R, Garcia P, Vasconcelos M, Rebelo O, Dinis A, Grazina M, Diogo L. (2008). **Acute necrotizing encephalopathy – a mitochondrial disorder?** J Inher Metab Dis 31 (S1):61.

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de Adenosina
ANT1	<i>Adenine Nucleotide Translocator</i> - translocador de nucleótidos de adenina
ATP	Trifosfato de Adenosina
CK	Creatina cinase
CNC	Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra
CoQ	Coenzima Q
COX	Citocromo c Oxidoreductase; Citocromo Oxidase
CPEO	Oftalmoplegia externa crónica progressiva
CRM	Cadeia Respiratória Mitocondrial
DCRM	Doença da Cadeia Respiratória Mitocondrial
DGUOK	Desoxiguanosina kinase
ENM	Extra Neuróxico e/ou Muscular
FAD	Flavina- Adenina Dinucleótido
FD-PCR	PCR de flanqueamento de deleções
FMN	Flavina Mononucleótido
HP	Hospital Pediátrico de Coimbra
¹ H RMS	Ressonância Magnética protónica
HUC	Hospitais da Universidade de Coimbra
KSS	Síndrome de Kearns-Sayre
LHON	<i>Leber Hereditary Optic Atrophy</i>
L-PCR	PCR de produtos longos
MELAS	<i>Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes</i>
MIDD	<i>Mitochondrial Inherited Diabetes and Deafness</i>
MILS	<i>Maternal Inherited Leigh Syndrome</i>
MIRA	<i>Mitochondrial Recessive Ataxia Syndrome</i>
MLASA	<i>Mitochondrial Myopathy, Lactic Acidosis, Sideroblastic Anemia</i>
MNGIE	<i>Mio-Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy</i>
MSL	<i>Multiple Symmetric Lipomatosis</i>
MS-PCR	PCR específica de mutação
mtDNA	Ácido Desoxirribinucleico mitocondrial
NADH	Nicotinamida - Adenina Dinucleótido
NARP	<i>Neuropathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa</i>
nDNA	Ácido Desoxirribinucleico nuclear
NM	Neuróxico e/ou Muscular
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>

PCR-AS	PCR- alelo-específica
PCR-RFLP	PCR com uso de enzimas de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>)
PS	Síndrome de Pearson
RMS	Ressonância Magnética
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RRF	<i>Ragged Red Fibres</i> – Fibras Vermelhas Rotas
SANDO	<i>Sensori-Ataxic Neuropathy, Disartry, Ophthalmoplegia</i>
SCAE	<i>juvenil Spino-Cerebelar Ataxia Epilepsy</i>
SDH	Succinato-desidrogenase
SNC	Sistema Nervoso Central
TAC	Tomografia Axial Computorizada
v.r.	Valor de referência
XL-PCR	PCR de produtos extra-longos

ÍNDICE DE TEXTO

CAPÍTULO 1 – RESUMO	1
CAPÍTULO 2 – INTRODUÇÃO	7
2.1 Razão de ser deste trabalho	9
2.2 Importância e actualidade do tema.....	11
2.2.1 Nota histórica.....	11
2.2.2 Dimensão do problema.....	12
2.2.3 Estrutura e funções energética e termogénica das mitocôndrias	13
2.2.4 Dupla regulação genética da mitocôndria.....	20
2.2.5 Stress oxidativo, apoptose e envelhecimento	24
2.3 As doenças da cadeia respiratória mitocondrial	27
2.3.1 Definição e manifestações clínicas	27
2.3.2 Diagnóstico e classificação.....	41
2.3.3 Fisiopatologia e tratamento.....	50
2.3.4 Prognóstico e aconselhamento genético.....	55
CAPÍTULO 3 - OBJECTIVOS	59
CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 Caracterização da amostra em estudo	65
4.2 Estudos mitocondriais	68
4.2.1 Estudos bioquímicos	68
4.2.2 Estudos anatomo-patológicos.....	70
4.2.3 Estudos de genética molecular	71
4.3 Critérios de diagnóstico utilizados.....	73
4.4 Incidência e prevalência na Região Centro de Portugal.....	82
4.5 Análise estatística	82
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS	83
5.1 Caracterização clínico-laboratorial da amostra	85
5.1.1 A clínica das crianças com suspeita de doença mitocondrial	85
5.1.2 Caracterização laboratorial da amostra.....	101
5.1.3 Classificação diagnóstica dos doentes.....	123
5.1.4 Análise de alguns aspectos particulares da amostra	132
5.2 Doença mitocondrial na criança na Região Centro de Portugal.....	141
5.2.1 Incidência.....	141
5.2.2 Prevalência	141
5.3 Análise da escala diagnóstica adoptada	142
5.4 Estudo mitocondrial funcional realizado - perspectiva clínica	145

5.4.1	Cetonémia	145
5.4.2	Estudo polarográfico	146
5.4.3	A actividade enzimática dos complexos da CRM.....	147
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO		157
6.1	Metodologia e resultados.....	159
6.1.1	Seleção clínico-laboratorial dos doentes	159
6.1.2	Abordagem laboratorial da mitocôndria	164
6.2	O diagnóstico final.....	188
6.2.1	Os critérios de diagnóstico adoptados	188
6.2.2	O grupo dos doentes com doença mitocondrial definida.....	195
6.2.3	Doenças da cadeia respiratória mitocondrial secundárias.....	196
6.2.4	Factores de possível interferência no diagnóstico	199
6.3	As doenças mitocondriais na Região Centro de Portugal	205
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES		207
7.1	Proposta de abordagem diagnóstica	210
7.2	Proposta de uma escala de classificação.....	215
7.3	O seguimento dos doentes – adopção de um protocolo internacional	218
CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		219
CAPÍTULO 9 – ANEXOS		253
9.1	Classificação genética das doenças mitocondriais.	255
9.2	Alterações do DNA mitocondrial investigadas.....	257
9.3	Critérios de Bernier que levaram à classificação dos doentes	266
9.4	Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle.....	274
9.5	Doença mitocondrial na Região Centro de Portugal -publicação	283

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1 - Importância da mitocôndria no metabolismo celular.	13
Figura 2 - Principais vias de produção de energia - papel da mitocôndria.....	14
Figura 3 - Estrutura da mitocôndria - compartimentos mitocondriais.	14
Figura 4 - Esquema funcional da cadeia respiratória mitocondrial.	17
Figura 5 - Dupla regulação genética da mitocôndria	21
Figura 6 - Segregação mitótica das mitocôndrias durante a divisão celular.	23
Figura 7 - Diversidade da apresentação clínica das DCRM.	30
Figura 8 - Mapa de morbilidade do genoma humano mitocondrial.	33
Figura 9 - Doenças da cadeia respiratória mitocondrial com origem no nDNA no mtDNA	35
Figura 10 - Distribuição dos casos investigados por anos do período de estudo.	85
Figura 11 - Mapa de distribuição dos doentes por distrito.....	86
Figura 12 - Idade de início de manifestações clínicas nos vários grupos etários	87
Figura 13 - Malformações congénitas na amostra em estudo.	89
Figura 14 - Pé convexo num dos doentes da nossa série.	89
Figura 15 - Sinais e sintomas de apresentação neurológica e/ou muscular em 152 doentes.	90
Figura 16 - Sinais e sintomas de apresentação ENM em 48 doentes.	91
Figura 17 - Apresentação cardíaca observada em 11 doentes.....	91
Figura 18 - Cardiomegália num doente com miocardiopatia dilatada	91
Figura 19 - Apresentação hepática observada em 10 doentes.	92
Figura 20 - Evolução clínica das 191 crianças sobreviventes à primeira semana de doença.	93
Figura 21 - Evolução neurológica em 175 crianças sobreviventes à primeira semana de doença.	93
Figura 22 - Desenvolvimento psicomotor nos sobreviventes à primeira semana de doença.	94
Figura 23 - Criança com encefalopatia epiléptica (síndrome de West).	94
Figura 24 - Sintomatologia atribuível a alteração dos pares cranianos.....	96
Figura 25 - Malnutrição (a); alimentação por gastrostomia (b) em crianças da nossa série.....	96
Figura 26 - Envolvimento oftalmológico em três doentes da nossa série	97
Figura 27 - Evolução cardíaca observada em 29 doentes.	98
Figura 28 - Evolução hepática observada em 31 doentes.	98
Figura 29 - Evolução da morbilidade e mortalidade em 197 doentes.	99
Figura 30 - Tipo de colheita de tecidos realizada em 200 doentes.....	102
Figura 31 - Tecidos estudados por doente.	102
Figura 32 - Exames complementares realizados para diagnóstico diferencial.....	103
Figura 33 - Exames complementares para diagnóstico diferencial - estudos moleculares.	105
Figura 34 - Atrofia corticosubcortical marcada e leucoencefalopatia num doente.....	107
Figura 35 - Imagens de RMN numa criança de dois anos com síndrome de Leigh.....	108
Figura 36 - Resultados do estudo histológico realizado em 191 doentes.	109
Figura 37 - Resultados do estudo histológico do músculo em microscopia óptica em 185 doentes. .	109
Figura 38 - Imagens do estudo histológico do músculo.	110
Figura 39 - Resultados do estudo histológico do fígado em microscopia óptica em 38 doentes.	111

Figura 40 - Lactacidemia em 197 doentes classificados em cinco classes de gravidade.	112
Figura 41 - ¹ H RMS num doente mostrando picos anormais de lactato.....	113
Figura 42 - Estudo <i>redox</i> realizado nos 200 doentes em estudo.	116
Figura 43 - Avaliação enzimática dos complexos I-V da CRM em 198 doentes.	117
Figura 44 - Actividade dos complexos enzimáticos da CRM em 198 doentes.	117
Figura 45 - Défices enzimáticos da CRM em 130 doentes.	118
Figura 46 - Défices enzimáticos <i>major</i> da CRM em 91 doentes.	119
Figura 47 - Actividade da CRM por tecido em 198 doentes.	119
Figura 48 - Rastreamento de mutações e deleções do mtDNA em 200 doentes.	120
Figura 49 - Classificação dos 200 doentes segundo os critérios de DCRM de Bernier.	123
Figura 50 - Diagnóstico de DCRM - critérios maiores registados em 100 doentes.	124
Figura 51 - Diagnóstico de DCRM - critérios clínicos <i>minores</i> registados em 182 doentes.....	125
Figura 52 - Diagnóstico de DCRM - critérios laboratoriais <i>minores</i> em 200 doentes.....	126
Figura 53 - Diagnóstico de DCRM - critérios laboratoriais em 200 doentes.	126
Figura 54 - Diagnóstico final dos 200 doentes em estudo.....	127
Figura 55 - Diagnóstico final em 200 doentes.	127
Figura 56 - Idade da colheita de tecidos em 200 doentes.....	130
Figura 57 - Demora no diagnóstico em 200 doentes.....	130
Figura 58 - Evolução do tipo de doente investigado ao longo do período do estudo.	131
Figura 59 - Evolução do diagnóstico final ao longo do período do estudo.....	131
Figura 60 - Análise de factores clínicos que influenciaram a sobrevida em 200 doentes.....	132
Figura 61 - Análise de factores laboratoriais que influenciaram a sobrevida em 200 doentes.	133
Figura 62 - Sobrevida e diagnóstico final.....	133
Figura 63 - Condições de colheita de tecidos e tipo de diagnóstico final, primário ou secundário....	135
Figura 64 - Condições da colheita de tecidos e diagnóstico final em 200 doentes.	135
Figura 65 - Medicação aquando da colheita de tecidos para estudos mitocondriais.	136
Figura 66 - Medicação anticonvulsivante aquando do estudo mitocondrial.....	136
Figura 67 - Classificação dos doentes segundo os critérios gerais de Nijmegen.....	142
Figura 68 - Critérios clínico-laboratoriais gerais de Nijmegen preenchidos pelos 200 doentes.	142
Figura 69 - Critérios clínico-laboratoriais gerais de Nijmegen preenchidos em 200 doentes.	143
Figura 70 - Classificação diagnóstica nos 200 doentes segundo os critérios de Nijmegen.....	143
Figura 71 - Aplicação das escalas geral de Nijmegen e Bernier adaptada à amostra.	144
Figura 72 - Relação entre a cetonemia e o grau de diagnóstico de DCRM.	146
Figura 73 - Complexo IV em músculo em função da expressão da actividade enzimática.....	148
Figura 74 - Valores normais de actividade enzimática da CRM nas várias unidades.	149
Figura 75 - Influência da <i>correção</i> para a citrato sintase no diagnóstico final em 198 doentes.	150
Figura 76 - Correlação entre os segmentos I+III e II+III e os respectivos complexos enzimáticos. 152	
Figura 77 - Actividade do complexo IV em três preparações de músculo de 41 doentes.	155
Figura 78 - Actividade dos complexos II a IV em linfócitos e no músculo em 90 doentes.....	156
Figura 79 - DCRM na criança - algoritmo diagnóstico.....	211

ÍNDICE DE TABELAS:

Tabela 1 - Critérios maiores de diagnóstico de DRCM aplicados aos 200 doentes.	74
Tabela 2 - Critérios clínicos <i>minor</i> de diagnóstico de DRCM aplicados aos 200 doentes.	75
Tabela 3 - Outros critérios menores de diagnóstico de DRCM aplicados aos 200 doentes.	77
Tabela 4 - Graus de diagnóstico final de DRCM segundo a classificação de Bernier.	77
Tabela 5 - Critérios <i>gerais</i> de DCRM de Nijmegen.	78
Tabela 6 - Graus de diagnóstico segundo os critérios <i>gerais</i> de DCRM de Nijmegen.	81
Tabela 7 - Relação entre a idade e o tipo de apresentação clínica em 200 doentes.	87
Tabela 8 - Relação entre a idade de início dos sintomas e o tipo de clínica na altura do estudo.	88
Tabela 9 - Apresentação clínica – outras alterações neurológicas em 14 doentes.	90
Tabela 10 - Classificação da epilepsia em 70 doentes investigados por suspeita de DCRM.	95
Tabela 11 - Mortalidade e tempo de evolução em 197 doentes.	100
Tabela 12 - Mortalidade em 53 doentes - idade do óbito.	100
Tabela 13 - Clínica na apresentação e tipo de doente - agudo ou crónico.	101
Tabela 14 - Circunstâncias clínicas no diagnóstico.	101
Tabela 15 - Suspeita de DCRM e infecção por vírus.	106
Tabela 16 - Exames de imagem cerebral realizados em 179 doentes.	106
Tabela 17 - Distribuição da atrofia do SNC em 94 doentes.	107
Tabela 18 - Distribuição das alterações detectadas na RMN e/ou TAC cerebral em 81 doentes.	108
Tabela 19 - Relação entre os valores do lactato plasma e no <i>líquor</i> em 93 doentes.	113
Tabela 20 - Relação entre a lactacidémia e os resultados da RMS em 34 doentes.	113
Tabela 21 - Relação entre o lactato no <i>líquor</i> e os resultados da RMS em 17 doentes.	114
Tabela 22 - Relação entre a alaninémia e a lactacidémia em 39 doentes.	114
Tabela 23 - Relação entre prolinémia e a lactacidémia em 173 doentes.	114
Tabela 24 - Relação entre a prolinémia e a alaninémia em 173 doentes.	115
Tabela 25 - Relação entre lactato, alanina e prolina no plasma e os resultados da RMS.	115
Tabela 26 - Correlação genótipo-fenótipo nos 23 doentes com alteração molecular.	122
Tabela 27 - Critérios clínico-laboratoriais que permitiram o diagnóstico final nos 200 casos.	124
Tabela 28 - Outros diagnósticos etiológicos em 38 doentes.	128
Tabela 29 - Outras doenças hereditárias do metabolismo em 12 doentes.	128
Tabela 30 - Grupos diagnósticos <i>versus</i> mortalidade.	134
Tabela 31 - Análise de alguns parâmetros clínicos nos dois subgrupos de DCRM definida.	140
Tabela 32 - Estimativa da incidência de DCRM na Região Centro de Portugal.	141
Tabela 33 - Actividade enzimática do complexo IV expressa de diversos modos.	147
Tabela 34 - Unidades de expressão da actividade do complexo IV - mitocôndrias de músculo.	148
Tabela 35 - Unidades de expressão da actividade do complexo IV - homogeneizado de músculo. ..	149
Tabela 36 - Influência da <i>normalização</i> para a citrato sintase no diagnóstico final em 198 doentes.	151
Tabela 37 - Algoritmo diagnóstico da DCRM na criança – notas.	212
Tabela 38 - Escala diagnóstica de DCRM proposta.	215
Tabela 39 - Comparação da escala de diagnóstico proposta com outras escalas de DCRM.	216

Tabela 40 - Alterações do mtDNA pesquisadas no início do estudo.	257
Tabela 41 - Delecções pesquisadas até 2004.....	257
Tabela 42 - Mutações pesquisadas até 2004.	258
Tabela 43 - Delecções do mtDNA pesquisadas a partir de 2005.	258
Tabela 44 - Mutações do mtDNA pesquisadas a partir de 2005.	259
Tabela 45 - Critérios maiores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier.	266
Tabela 46 - Critérios menores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier.	270
Tabela 47 - Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle (0 - 24 M).	275
Tabela 48 - Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle (2 - 11 A).	277
Tabela 49 - Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle (12 - 18 A).	280

CAPÍTULO 1 – RESUMO

1. RESUMO

Neste trabalho analisou-se a clínica, o diagnóstico, o prognóstico e a epidemiologia das doenças da cadeia respiratória mitocondrial (doença mitocondrial) em crianças na Região Centro de Portugal, uma década após o início do diagnóstico sistemático destas doenças no Hospital Pediátrico de Coimbra, em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra. O principal objectivo foi retirar, da nossa e da experiência de outros grupos, os ensinamentos necessários a uma melhor orientação futura destes doentes.

O objecto do estudo é o grupo das 200 crianças cuja suspeita de doença mitocondrial foi investigada com recurso à análise de amostras de músculo esquelético (193 casos), fígado (41) e/ou miocárdio (11), no período de 1997 a 2006 (10 anos).

As manifestações clínicas tiveram início no primeiro ano de vida em 71% dos casos (no período neonatal em 35%). Em 153 crianças a apresentação foi neurológica e/ou muscular. Cento e setenta e cinco doentes evoluíram com clínica do sistema nervoso central, 44 dos quais com doença multissistémica. A gravidade clínica traduziu-se em elevada mortalidade (27%), em grande percentagem de casos com agravamento clínico (13%) e em investigação etiológica alargada na maior parte dos casos.

Os doentes foram classificados segundo os critérios clínico-laboratoriais de Bernier para o diagnóstico de doença mitocondrial em quatro níveis de probabilidade diagnóstica: definida (95 casos), provável (77), possível (10) e improvável (18).

O diagnóstico de doença mitocondrial foi baseado na presença de uma síndrome (18 casos, oito com síndrome de Leigh), de alterações do DNA mitocondrial e/ou nuclear (nove), de fibras musculares vermelhas rotas (dois) e sobretudo na identificação de défice enzimático *major* da cadeia respiratória (91). A estes critérios maiores, associou-se uma grande diversidade de critérios menores clínicos, metabólicos, enzimáticos, histológicos e genéticos. Os défices enzimáticos dos complexos IV (89 doentes) e I (68) foram os mais frequentes, tal como tem sido referido em outras séries.

Em 84 doentes (42%) não se obteve um diagnóstico etiológico. Setenta e oito crianças (39%) tiveram o diagnóstico de doença mitocondrial. Em 38 casos (19%) chegou-se a um outro diagnóstico etiológico, destacando-se o grupo das outras doenças metabólicas e o das infecções virais. Dezassete destas 38 crianças cumpriam critérios de doença mitocondrial definida, que foi considerada secundária.

Confirmou-se a grande variabilidade e a não especificidade clínica das doenças mitocondriais na criança, através da semelhança entre os vários grupos de diagnóstico na nossa série.

A incidência e prevalência destas patologias são estimadas quase sempre em estudos retrospectivos como este. Variam amplamente com a população em causa e o modo de selecção dos doentes, a extensão da investigação etiológica e os critérios de diagnóstico

aplicados. A incidência de doença mitocondrial com manifestação clínica na primeira década de vida, na Região Centro, foi estimada em 1/6500 nado-vivos, valor elevado em comparação com outras séries pediátricas. Em 2006, a prevalência pontual destas doenças nesta Região era de 1/ 18500 habitantes com menos de 10 anos de idade, o que está de acordo com a sua elevada mortalidade na infância.

A abordagem diagnóstica das doenças mitocondriais é complexa, não existindo uma prova simples que as confirme ou exclua. O aparente peso excessivo dos défices enzimáticos da cadeia respiratória no diagnóstico e a pobreza relativa de alterações histológicas nos nossos doentes levou à análise detalhada dos estudos mitocondriais realizados (quer os inespecíficos, como os níveis de lactato, quer os específicos como a actividade enzimática). Assim, reclassificou-se os doentes aplicando a escala de Nijmegen, após exclusão dos dados enzimáticos e moleculares. Muito mais casos atingiram deste modo um nível superior de probabilidade diagnóstica, o que atesta a validade dos argumentos da suspeita diagnóstica e corrobora os resultados do estudo enzimático neste grupo de crianças.

O diagnóstico dos nossos doentes baseou-se na clínica e no estudo bioquímico da cadeia respiratória, como seria de esperar numa população pediátrica, em que a maioria dos casos se deve a alterações do DNA nuclear. Ao contrário da investigação do DNA mitocondrial, realizada amplamente nos nossos doentes com uma taxa de diagnóstico molecular muito baixa, o estudo do DNA nuclear, efectuado em poucos casos, foi frequentemente positivo. É necessário maior investimento nos estudos moleculares, uma vez que as alterações mitocondriais, tanto enzimáticas como morfológicas, são muitas vezes secundárias.

Elaborou-se um fluxograma diagnóstico que correlaciona a clínica, as alterações enzimáticas da cadeia respiratória, os achados histológicos e as alterações patogénicas do DNA mitocondrial e nuclear.

Com base nesta análise e nos recursos disponíveis, propõe-se uma escala diagnóstica, inspirada na de Nijmegen, a aplicar no Hospital Pediátrico. Esta baseia-se numa tabela de dupla entrada com os critérios clínico-laboratoriais gerais de Nijmegen e os resultados do estudo enzimático da cadeia respiratória (ambos escalonados em improvável, possível, provável e definido). A escala proposta é mais restritiva em termos de probabilidade de diagnóstico final de doença mitocondrial para o caso individual do que a utilizada neste trabalho, reforçando-se a importância da clínica e dos estudos bioquímicos e histológicos na orientação da investigação molecular, de acordo com o fluxograma diagnóstico referido.

Conclui-se pela necessidade do reforço da colaboração entre os grupos que investigam estas doenças, no sentido de estabelecer critérios de diagnóstico, definição e classificação uniformes. Só definindo a sua prevalência e história natural é possível organizar adequadamente o apoio aos doentes e famílias.

SUMMARY

In this study a review of the clinical presentation, diagnosis, prognosis and epidemiological data of childhood mitochondrial respiratory chain disorders (mitochondrial disorders) in the Central Region of Portugal is presented.

This analysis was carried out one decade after the introduction of this diagnosis in the Paediatric Hospital of Coimbra, in cooperation with the Laboratory of Biochemical Genetics at the Centre for Neurosciences and Cell Biology of the University of Coimbra.

The main objective is to improve clinical evaluation and follow-up of patients, based on our experience and that of other groups.

For this purpose, we reviewed the clinical files of all 200 children whose investigation for a mitochondrial disorder included the analysis of muscle (193 patients), liver (41) and/or myocardium (11) samples, over a period of 10 years (1997 to 2006).

Thirty five percent of the patients presented the disorder in the neonatal period and 71% in the first year of life. At presentation, 153 children had neurologic and/or muscular symptoms. Throughout evolution, central nervous system dysfunction affected 175 children, frequently in the context of multisystemic involvement (44 patients). Clinical severity was revealed by the high mortality (27%) and disease progression (13%) rates and by the extended etiological investigation performed in most cases.

Patients were classified, according to Bernier criteria for mitochondrial disease in children, in four diagnostic probability groups: definite (95 cases), probable (77) possible (10) and unlikely (18). Diagnostic classification was based on the identification of a known mitochondrial syndrome (18 patients, eight with Leigh syndrome), pathogenic mitochondrial DNA and/or nuclear DNA mutations (nine), ragged red fibres (two) and a *major* respiratory chain enzymatic defect (91). Other *minor* clinical, metabolic, enzymatic, histopathological and genetic criteria also contributed to the diagnosis of these patients. Respiratory chain enzymatic complexes IV (89 patients) and I (68) were the most frequently affected, as in other series.

In 84 patients (42%), an etiological diagnosis was not achieved. A mitochondrial respiratory chain disorder was established in 78 children (39%). A different diagnosis was found in 38 cases, other metabolic disorders and viral infections being the most commonly identified. Seventeen of these patients fulfilled criteria for definite mitochondrial disease and were classified as secondary.

We have corroborated the great clinical variability and non-specific features of mitochondrial diseases in children through the similarity among the diverse diagnostic groups in our series.

Mitochondrial disease incidence and prevalence are usually estimated through retrospective studies like the present one. Figures vary a lot, depending on the population under study and patient selection, investigation thoroughness, and diagnostic

criteria. Incidence of mitochondrial disease in children under 10 years of age in the Central Region of Portugal was 1/ 6500 newborns, which is high compared to other paediatric series. In 2006 the prevalence in this region was 1/ 18500 children under 10 years of age, which confirms the high mortality caused by these disorders in childhood.

The diagnostic approach for mitochondrial disorders is complex, since there is no simple test to confirm or exclude them. The apparent over-representation of respiratory chain enzymatic deficits and the relative paucity of histological abnormalities in our patients led us to analyse the mitochondrial studies performed. The patients were reclassified using the Nijmegen scale, after exclusion of enzymatic and molecular genetic data. With this new classification (the clinical and laboratory Nijmegen general criteria), a higher level of diagnostic certainty was obtained, confirming the value of diagnostic suspicion and respiratory chain enzymatic evaluation in this group of children.

The diagnosis in our patients was mostly based on the clinical and respiratory chain biochemical studies, as would be expected in a paediatric population, in whom most mitochondrial disorders are caused by mutations in the nuclear DNA. These were investigated in only a few patients in our series and frequently yielded positive findings. As expected, pathogenic mutations in mitochondrial DNA, although broadly investigated, were rarely found.

Since mitochondrial abnormalities, both enzymatic and morphological, are frequently secondary to other disease states, it is crucial to carry out in depth molecular genetic studies. A diagnostic chart, which emphasises the correlation of clinical, histological and enzymatic data with pathogenic mitochondrial and nuclear abnormalities, is presented in this work.

Taking into account the present study and our resources, a new diagnostic scale based on the Nijmegen group classification, to be used in our Hospital, is proposed. It consists of two groups of data (clinical, metabolic/ imaging and histopathology versus respiratory chain enzymatic activity), both classified as definite, probable, possible and unlikely. The combination of general and enzymatic criteria allows a final patient diagnosis to be made. This new classification, being more restrictive than the one we employed in the present study, strengthens the need to use the entire patient's data to decide on the appropriate molecular genetic studies, according to the proposed diagnostic chart.

We conclude that there is a great need to reinforce collaboration among the groups investigating mitochondrial disorders, in order to establish uniform diagnostic criteria, a definition and classification. Adequate support to patients and families will not be possible unless the prevalence and natural history of these disorders are well defined.

CAPÍTULO 2 – INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

2.1 Razão de ser deste trabalho

Este trabalho é o corolário da minha actividade clínica que desde cedo foi guiada pela circunstância de ser igualmente Assistente Convidada de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A minha vida académica tem-se centrado em transmitir aos alunos de Medicina os conhecimentos de Bioquímica que fui adquirindo ao longo dos anos, *coando-os* pelo filtro da aplicação à clínica.

O meu interesse pelas doenças da cadeia respiratória mitocondrial (DCRM) foi suscitado na segunda metade da década de 80, então interna de Pediatria do Hospital Pediátrico de Coimbra (HP), ao deparar-me com alguns casos clínicos em que a DCRM era incluída no diagnóstico diferencial, enfrentando a frustração pela incapacidade de o provar ou excluir. Recordo em particular dois doentes, actualmente adultos e já transferidos para clínica de adultos, com Síndrome de Leigh. Sabe-se agora que ambos têm mutação no gene *SURF1* com défice do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). À época, a hipótese de DCRM era apenas uma conjectura diagnóstica. Senti assim a necessidade de pugnar para que o diagnóstico deste grupo tão importante de patologias metabólicas pudesse ser feito no âmbito do HP. Encontrava-me numa posição privilegiada de *ponte* entre a clínica e o laboratório devido ao cargo de Assistente de Bioquímica. A Professora Doutora Catarina Oliveira dirigia várias linhas de investigação no âmbito das ciências neurológicas, que incluía algumas áreas afins das DCRM, como a patologia do envelhecimento. Reconhecida a necessidade e a possibilidade, foi a Professora Doutora Manuela Grazina fazer um estágio na investigação laboratorial, bioquímica e genética das DCRM no Serviço do Professor A. Munnich, em Paris. Em 1993, a Consulta de Doenças Metabólicas, a funcionar no HP desde 1987, deu lugar à *Unidade de Doenças Metabólicas*, com uma pediatra e mais tarde duas, dedicadas quase em exclusividade às doenças hereditárias do metabolismo. O reconhecimento da importância das DCRM na patologia pediátrica por parte da direcção clínica do HP, associado aos grandes avanços clínicos e tecnológicos entretanto verificados, permitiu a implantação do diagnóstico laboratorial das DCRM no Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (CNC). Em 1996 foram finalmente criadas condições para o estudo funcional da CRM e do ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) em amostras de tecidos humanos naquele Laboratório. A resposta regular às solicitações clínicas começou a ser dada no ano seguinte, tendo vindo a ser continuamente optimizada. O percurso foi longo e difícil. Trabalhámos muitas vezes em *hipoxia* e em *desacoplamento entre a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa*. Posso por isso dizer que se produziu muito lactato e se perdeu

muita energia sob a forma de calor! Mas essa aprendizagem foi extremamente importante e o *rendimento energético* é já razoável, embora haja ainda muito caminho a percorrer, nomeadamente em termos de estudos de genética molecular.

Quando tenho de comunicar às famílias ou aos doentes a suspeita de DCRM recorro habitualmente a metáforas, comparando as células dos tecidos e órgãos humanos a *fábricas especializadas* e realçando a importância das *centrais energéticas* que são as mitocôndrias no funcionamento daquelas. O tema é desenvolvido, comparando a produção de energia a partir dos alimentos a uma *fogueira* onde se dá a sua *combustão*, com consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono e água. Esta imagem, embora primitiva, é bastante útil, pois permite explicar os eventuais factores concorrentes para o mau funcionamento da referida *fogueira*, bem como as consequências daí resultantes, como o fraco rendimento energético que atinge os órgãos de modo diferente e a acumulação de *fumo*, traduzido pelo lactato e as espécies reactivas de oxigénio (*Reactive Oxygen Species - ROS*), com os inerentes prejuízos no funcionamento celular. Uma outra imagem que me tem sido útil para explicar a fisiopatologia das DCRM é a comparação da produção de energia química, a síntese do trifosfato de adenosina (ATP), com a de energia nas centrais hidroeléctricas: cada um dos *degraus* da CRM (complexos I, III e IV) corresponderia aos da queda de água, cuja energia cinética é armazenada na barragem. A perturbação do funcionamento do(s) *degrau(s) da central hidroeléctrica*, a incapacidade de aí fazer chegar a água ou de a recolher a jusante, impediria o adequado armazenamento de energia. Por outro lado, a água *desperdiçada* nessas circunstâncias poderia provocar *estragos*, à semelhança da acção das *ROS*. Esta imagem permitiu explicar a utilização de coenzimas e *varredores de radicais livres* nas terapêuticas propostas. Recordo em particular a reacção de um casal que tinha feito aturadas pesquisas na internet quando soube que vinha à consulta por suspeita de DCRM: após a explicação, socorrendo-me de um esquema desenhado na hora, as expressões de plena compreensão foram reforçadas por um *afinal, isto é extraordinariamente simples!*

É óbvio que as DCRM estão muito longe de ser simples! Espero com este trabalho contribuir para a divulgação entusiasta deste assunto de tanta relevância clínica, de modo a torná-lo mais inteligível e interessante e simultaneamente combater o preconceito de que a Bioquímica é uma ciência, *intragável* e *perfeitamente dispensável* numa prática clínica de qualidade.

2.2 Importância e actualidade do tema

2.2.1 Nota histórica

Nos finais do século XVIII, Antoine Lavoisier provou que o oxigénio constituinte do ar permitia a combustão de compostos orgânicos. As mitocôndrias foram observadas pela primeira vez por citologistas há menos de dois séculos (1840). No primeiro quartel do século XX, foram desenvolvidas experiências decisivas sobre mecanismos da respiração e feita a caracterização da citocromo oxidase (COX). Só em meados do século XX foi possível isolar as mitocôndrias através do fraccionamento subcelular por centrifugação diferencial e demonstrar que são o local da respiração celular, observar a sua estrutura em dupla membrana e relacioná-las com o ciclo de Krebs, a β -oxidação dos ácidos gordos, a CRM e a fosforilação oxidativa. Simultaneamente foi sendo descrita a CRM localizada na membrana interna da mitocôndria e a ligação entre o transporte de electrões e a síntese de ATP. Na mesma época, foi demonstrado o duplo controlo genómico em mitocôndrias de levedura. (Resenha histórica adaptada de Lestienne, 1999).

Em 1961 Peter Mitchell propôs a teoria quimiosmótica, segundo a qual a transferência de energia entre o transporte de electrões na CRM e a síntese de ATP era mediada por um gradiente electroquímico transmembranar de protões (Mitchell, 1961).

Luft e colaboradores (1963) descreveram o primeiro caso de doença mitocondrial (*um caso de hipermetabolismo não tiroideu*), devido a um defeito no acoplamento entre a CRM e a fosforilação oxidativa. No mesmo ano surgiria o conceito de fibras vermelhas rotas (*Ragged Red Fibres - RRF*) associadas às doenças mitocondriais (Engel e Cunningham, 1963).

Em 1977 Shapira descreveu as doenças mitocondriais como encefalomiopatias e dez anos mais tarde DiMauro publicou uma classificação bioquímica destas doenças (DiMauro et al., 1987). O carácter potencialmente multissistémico das doenças mitocondriais, bem evidente na criança, levou Munnich e o grupo francês a designá-las por citopatias mitocondriais (Munnich et al., 1996).

Entretanto, foram sendo dados passos decisivos na caracterização molecular das doenças mitocondriais: em 1981 Sanger e a sua equipa estabeleceram a sequência completa do mtDNA da placenta humana. Em 1988 foram identificadas as primeiras deleções do mtDNA, heteroplásmicas, em algumas doenças neuromusculares e a principal mutação associada à neuropatia óptica hereditária de Leber (*Leber Hereditary Optic Neuropathy - LHON*) (Holt et al., 1988; Lestienne e Ponsot, 1988; Wallace et al., 1988). Em 1993 antecipava-se o interesse de uma classificação genética das doenças mitocondriais, embora só dois anos mais tarde tivesse sido relatada a primeira mutação do DNA nuclear (nDNA) (DiMauro e Moraes, 1993; Bourgeron et al., 1995).

O conceito actual de doença mitocondrial restringe-se às doenças primárias da fosforilação oxidativa - *Oxphos disorders* (entendida esta como a cadeia respiratória e a síntese de ATP) ou DCRM (Naviaux, 2004). Apesar de todos os progressos, o diagnóstico destas patologias continua a ser difícil na maior parte dos casos, sobretudo na criança.

Em Portugal, a Unidade de Biologia Clínica do Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães do Porto (a partir de 1995) e o Laboratório de Bioquímica Genética do CNC (desde 1996) prestam serviço de diagnóstico das DCRM para todo o País.

2.2.2 Dimensão do problema

As DCRM são um importante grupo de doenças hereditárias do metabolismo de reconhecimento crescente nas últimas décadas. Até há poucos anos, eram encaradas como excepcionalmente raras, afectando um a dois indivíduos por milhão e mesmo incompatíveis com a vida pós-natal. Em 1996 as DCRM foram consideradas das doenças hereditárias do metabolismo mais frequentes em Neurologia Pediátrica (Zeviani et al., 1996). No mesmo ano, foi realçado o facto de as manifestações extra neurológicas das DCRM serem muito frequentes na criança (Munnich et al., 1996).

Estudos epidemiológicos recentes têm concluído por uma incidência entre 1/2000 e 1/7600 nado-vivos, colocando as DCRM ao nível das doenças hereditárias do metabolismo mais frequentes, mesmo mais do que a fenilcetonúria, cuja incidência no rastreio em Portugal é de 1/10000 (Naviaux, 2004; Schaefer, 2004; Thorburn, 2004; <http://www.diagnosticoprecoce.org/>). Metade dos casos manifestar-se-ia clinicamente nos primeiros cinco anos de vida e os restantes mais tarde, desde a idade escolar até à terceira idade (Naviaux, 2004; Schaefer, 2004).

No que diz respeito à prevalência das DCRM, os dados são mais escassos. A prevalência pontual de DCRM, em doentes diagnosticados entre 1984 e 1998, com idades abaixo dos 16 anos numa população de 360000 habitantes na Suécia ocidental era de 4,7 /100000 (Darin et al., 2001). A prevalência de doenças causadas por mutações do mtDNA numa população adulta em idade activa, no nordeste de Inglaterra, foi estimada em 6,6 /100000 (Chinnery e Turnbull, 2001).

Um estudo epidemiológico das DCRM no noroeste de Espanha, que envolveu 51 doentes de 0-16 anos, diagnosticados entre 1990 e 2004, revelou uma incidência de 1,43 casos / ano e uma prevalência de 8,7 casos / 100000 habitantes/ano (Castro-Gago et al., 2006).

É de prever que aqueles números venham a aumentar nos próximos anos devido ao maior alerta dos clínicos para estas patologias, à expansão da capacidade de diagnóstico laboratorial e ao sucessivo reconhecimento de novos quadros clínicos de apresentação e das alterações genéticas subjacentes (Testa et al., 2005).

2.2.3 Estrutura e funções energética e termogénica das mitocôndrias

Estrutura funcional - Como se ilustra nas figuras 1 e 2, as mitocôndrias são organelos intracelulares com funções de extrema importância, com destaque para a síntese de ATP, a principal fonte intracelular de energia. Neste contexto, a oxidação do piruvato, a β -oxidação dos ácidos gordos, a cetogénese e o ciclo de Krebs, isto é, as principais vias metabólicas produtoras de energia, processam-se na mitocôndria.

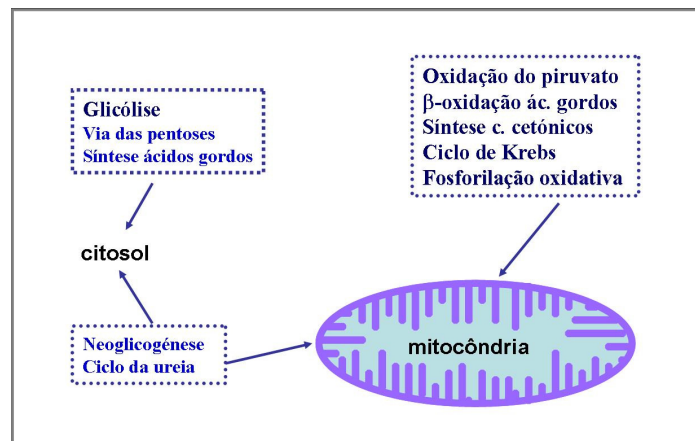


Figura 1 - Importância da mitocôndria no metabolismo celular.

As mitocôndrias estão envolvidas em muitos outros processos, como a interconversão de aminoácidos e a biossíntese das porfirinas/do heme e da ureia (Stryer, 1995; Nelson e Cox, 2000). Têm ainda papel relevante na homeostase intra-celular do cálcio (com implicações em muitas vias de sinalização intracelular), na regulação da libertação pancreática de insulina e na apoptose (Nelson e Cox, 2000; Brookes et al., 2004).

As mitocôndrias têm sido descritas como organelos de forma oval, bem delimitados, com dupla membrana, em que a membrana interna, de muito maior superfície do que a externa, é pregueada, como ilustrado na figura 3 (Stryer, 1995; Nelson e Cox, 2000). A noção de mitocôndrias como organelos independentes e estáticos está ultrapassada. O conceito actual é de que se trata de uma estrutura citoplasmática flexível, em que ocorre fusão, fissão e movimento intracelular de um modo constante e rápido, para o que são necessárias dinaminas e outras proteínas em relação estreita com o citoesqueleto. Aquela flexibilidade é funcionalmente vantajosa, nomeadamente ao permitir uma distribuição intracelular não homogénea e variável, dependente das necessidades regionais de energia, bem como uma relação de proximidade com o retículo endoplásmico, o principal local de armazenamento celular de cálcio (Brookes et al., 2004; Koopman et al., 2005).

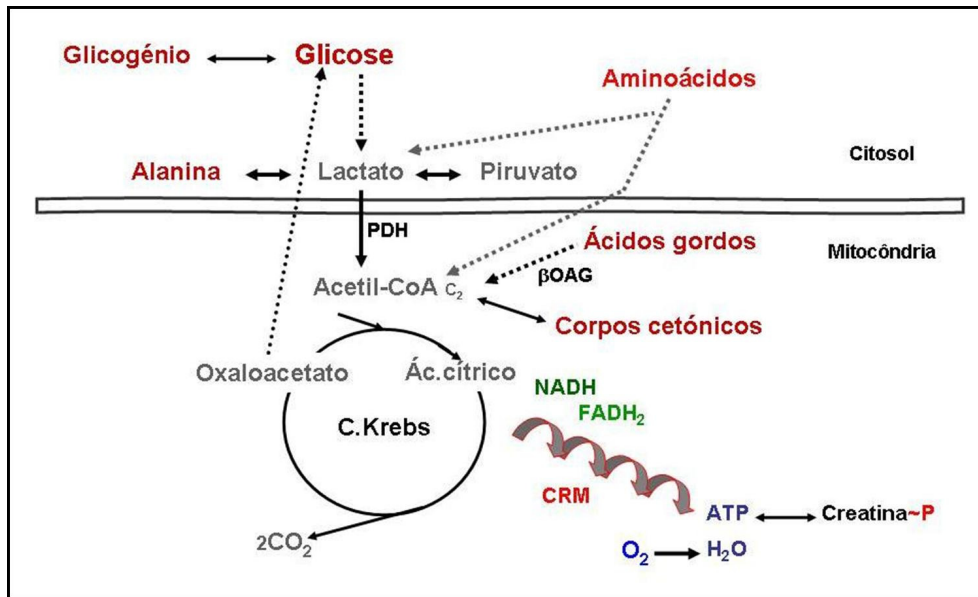


Figura 2 - Principais vias de produção de energia - papel da mitocôndria.

Abreviaturas: PDH- piruvato-desidrogenase; βOAG - β-oxidação dos ácidos gordos; CRM- cadeia respiratória mitocondrial; NADH- nicotinamida-adenina dinucleótido reduzido; FADH₂- flavina-adenina dinucleótido reduzido; ATP- trifosfato de adenosina.

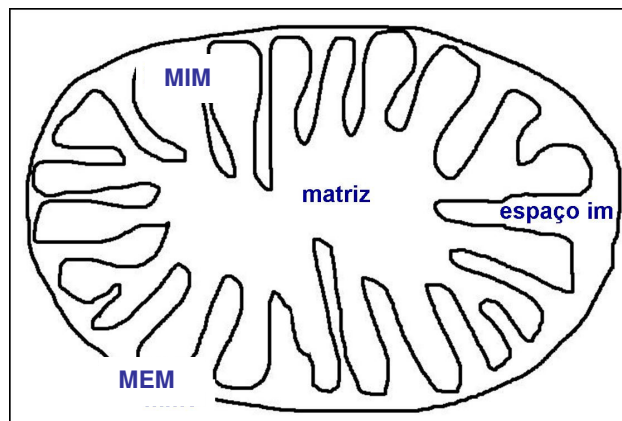


Figura 3 - Estrutura da mitocôndria - compartimentos mitocondriais.

Abreviaturas: MIM- membrana interna da mitocôndria; MEM- membrana externa; espaço im- espaço intermembranar.

A existência da dupla membrana permite definir na mitocôndria quatro regiões: a matriz, a membrana interna, a membrana externa e o espaço intermembranar (figura 3). As duas membranas mitocondriais são muito diferentes, tanto na composição como na função. A membrana externa da mitocôndria é permeável a grande parte de pequenas moléculas e aos iões, devido à sua riqueza em porina, proteína transmembranar que funciona de *poro*. A passagem de cálcio é, no entanto, feita através de um transportador: o canal aniônico dependente de voltagem da membrana externa da mitocôndria (Brookes et al., 2004). A membrana interna da mitocôndria contém um fosfolípido específico, a cardiolipina e é extremamente rica em proteínas, muitas das quais com acção

enzimática. É impermeável a quase todos os iões e moléculas polares. O potencial de membrana da membrana interna da mitocôndria é negativo do lado da matriz e positivo do lado do espaço intermembranar (cerca de $-0,15V$). Este potencial de membrana é muito importante no transporte mitocondrial de biomoléculas.

Para a travessia de metabolitos através da membrana interna da mitocôndria existem transportadores e mecanismos de transporte (*shuttles*) específicos. No caso do dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) produzido no citosol, por exemplo, durante o processo da glicólise e dada a impermeabilidade da membrana interna da mitocôndria ao NADH, a transferência de equivalentes reduzidos efectua-se através de reacções acopladas. Assim, é utilizado o *shuttle* do malato-aspartato, nomeadamente no fígado, rim e coração, que permite a formação de 2,5 moléculas de ATP por cada NADH. Este *shuttle* é reversível e só é activado no sentido do transporte de NADH para dentro da mitocôndria se a relação $NADH/NAD^+$ for maior no citosol do que na mitocôndria. Pode ainda ser usado o *shuttle* do glicerol-3-fosfato, que irá fornecer os equivalentes reduzidos ao dinucleótido de flavina e adenina (FADH) mitocondrial, formando-se $FADH_2$, o qual é posteriormente oxidado na CRM. O rendimento energético é menor ($1,5\text{ ATP}/FADH_2$), contudo a produção de energia, isto é, de ATP, é mais célere. Um outro importante exemplo de proteína de transporte específica da membrana interna da mitocôndria é o transportador de nucleótidos da adenina [ATP-adenina dinucleótido (ADP) translocase (ANT1)]: a concentração mitocondrial de ADP é um factor limitante da síntese de ATP. (Stryer, 1995; Nelson e Cox, 2000).

Função energética - Dizer que as mitocôndrias são as *centrais energéticas das células* é um lugar comum. De entre as vias metabólicas orientadas mais especificamente para a produção de energia, apenas a oxidação da glicose a piruvato é extramitocondrial (figuras 1 e 2). A oxidação completa da glicose dá origem a 30 a 32 moléculas de ATP, 25 a 27 das quais são produzidas na mitocôndria (Stryer, 1995). O sistema de fosforilação oxidativa ou CRM em sentido lato, composto por cinco complexos enzimáticos multiproteícos (I-V) localizados na membrana interna da mitocôndria e dois transportadores móveis de electrões, coenzima Q (CoQ) e citocromo c, é a via comum final para a produção de energia intracelular, seja ela derivada dos glúcidos, lípidos ou prótidos (figura 2). A oxidação das moléculas produtoras de energia (glicose, ácidos gordos e esqueleto carbonado dos aminoácidos) está a cargo de oxidoreductases, enzimas que associam a oxidação dos substratos à redução de coenzimas (NAD^+ e FADH). Estas serão subsequentemente reoxidadas na CRM, sendo os electrões e protões transferidos *em cascata*, de acordo com o potencial redox dos substratos, até ao oxigénio molecular, com formação de ATP e água.

O fluxo de electrões do NADH e do $FADH_2$ até ao oxigénio molecular é promovido por uma diferença de potencial de $1,14V$ e de $0,88\text{ volts}$, respectivamente (potencial de

redução ou *redox*, E_0' : NADH -0,32; FADH -0,06; O_2 0,82V). Processa-se através dos complexos proteicos I a IV da CRM e dos dois transportadores, como já referido. O NADH é reoxidado a nível do complexo I (NADH desidrogenase), que transfere os electrões para o complexo III (citocromo reductase), via CoQ. Daí, os electrões transitam para o citocromo c e o complexo IV ou COX até ao oxigénio. O FADH₂ cede os seus electrões directamente à CoQ. O fluxo de electrões através da CRM é um processo exergónico, isto é, os electrões perdem energia livre em cada transferência, sendo esta perda suficientemente importante a nível dos complexos I, III e IV, de modo a promover a translocação de protões da matriz para o espaço intermembranar. Este movimento cria um gradiente de $[H^+]$, com alteração do potencial de membrana, acentuando a sua negatividade. O retorno dos H^+ à matriz é o motor da síntese de ATP, levada a cabo pelo complexo V, ATP sintase. Assim, na fosforilação oxidativa a força electromotriz libertada pela oxidação das macromoléculas é convertida, através de um fluxo/refluxo de protões (força protonomotriz), em ligações fosfato de alta energia (Nelson e Cox, 2000). Esta interdependência entre a transferência de electrões provenientes da oxidação dos substratos a nível da CRM e a síntese de ATP, designada por *acoplamento* foi postulada em 1961 por Mitchell, como anteriormente referido (Mitchell, 1961).

A oxidação da maior parte das moléculas bioenergéticas gera NADH, que ao ser oxidado na CRM, produz cerca de 2,5 moléculas de ATP/molécula. Em alguns passos da oxidação dos ácidos gordos e de outros ácidos orgânicos há redução do FAD (em vez do NAD), integrado em flavoproteínas transportadoras de electrões que incluem o complexo II. A oxidação de uma molécula de FADH₂ leva à produção de 1,5 moléculas de ATP.

Em resumo, a CRM é constituída por três *bombas* de protões (complexos I, III e IV) ligadas por dois transportadores móveis de electrões (CoQ e o citocromo c), associadas a flavoproteínas transportadoras de electrões (que incluem o complexo II) e à ATP sintase, complexo V (figura 4).

O complexo I (NADH desidrogenase ou NADH-Q reductase) é o maior complexo da CRM. É constituído por 46 subunidades, sete das quais codificados pelo mtDNA (figura 5). Tem a forma de um L (ou de bota): a parte horizontal, hidrofóbica, embebida na membrana interna da mitocôndria, contém as subunidades codificadas pelo mtDNA (ND1 a ND6 e ND4L) e a parte vertical, hidrofílica, projecta-se na matriz (Janssen et al., 2006b). Ao seu nível, os electrões do NADH são transferidos para um grupo prostético de flavina-mononucleótido (FMN) e daí para uma série de núcleos ferro-enxofre, onde o ferro alterna entre as formas oxidada (Fe^{3+}) e reduzida (Fe^{2+}).

O fluxo de dois electrões do NADH para CoQ através do complexo I leva à saída de quatro H^+ da matriz para o espaço intermembranar.

O complexo II (ou succinato-CoQ reductase), de que faz parte a succinato desidrogenase, enzima do ciclo de Krebs, catalisa a oxidação do succinato a fumarato com redução do seu grupo prostético, FAD. Os electrões do FADH₂ são transferidos para

centros Fe-S e daí para a CoQ. É constituído por quatro subunidades, todas codificadas pelo nDNA (figura 5).

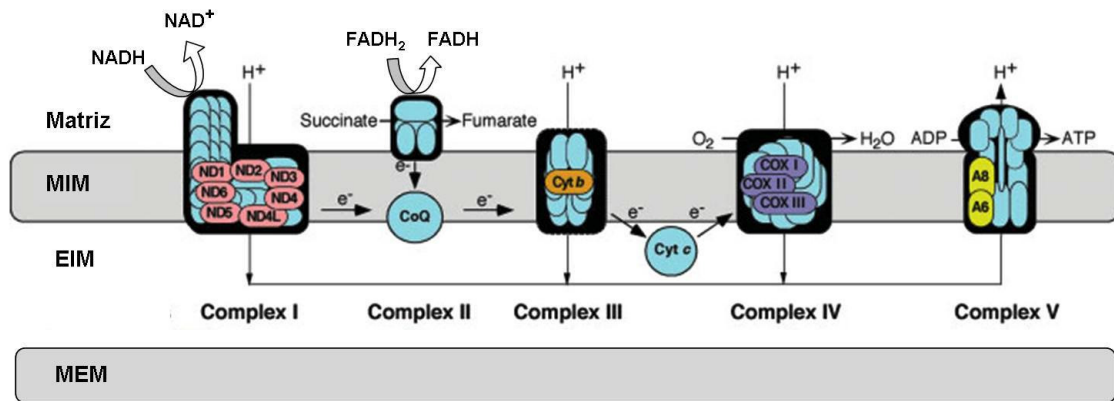


Figura 4 - Esquema funcional da cadeia respiratória mitocondrial.

Está indicado o fluxo de electrões do NADH através do complexo I e do FADH₂ do complexo II e outras flavoproteínas para a coenzima Q e desta para o complexo III. Os electrões passam do complexo III ao IV através do citocromo c e finalmente ao oxigénio. O gradiente electroquímico criado pela transferência de protões para o espaço intermembranar (a nível dos complexos I, III e IV) promove a na síntese de ATP pelo complexo V, formando-se água.

Abreviaturas: MIM -membrana interna da mitocôndria; EIM- espaço intermembranar; MEM- membrana externa da mitocôndria; CoQ- Coenzima Q; Cytb- citocromo b.

(Adaptado de DiMauro e Schon, 2006)

A glicerol-fosfato desidrogenase e as desidrogenases dos ácidos gordos apresentam o mesmo mecanismo de transferência de electrões para a CRM. Tanto o complexo II, como as outras flavoproteínas que transferem electrões do FADH₂ para a CoQ não são bombas de protões porque a variação de energia livre da reacção é pequena.

A ubiquinona, CoQ₁₀ ou CoQ, de presença ubiquitária nas membranas celulares, é um derivado de quinona, com uma longa cauda isoprenóide (de 10 unidades), que a torna praticamente apolar e lhe permite difundir rapidamente na zona central da membrana interna da mitocôndria. Varia entre a forma oxidada, ubiquinona e a reduzida, ubiquinol (CoQH₂), transportando dois electrões por molécula.

O complexo III (ubiquinol - citocromo reductase ou complexo citocromo bc1) é constituído por 11 polipeptídeos, um dos quais de síntese mitocondrial (citocromo b) (figura 5). Da composição do complexo III fazem parte dois tipos de citocromos (b e c1) e uma proteína Fe-S. Os electrões são transferidos para o núcleo Fe-S e depois para os citocromos c1 e b. O fluxo de um par de electrões através deste complexo leva à extracção/saída de dois H⁺ da matriz.

O citocromo c é uma proteína hidrossolúvel, constituinte de uma vasta família de proteínas que contêm heme e são transportadores de electrões (um por molécula), variando o ferro hémico entre as formas Fe^{2+} e Fe^{3+} .

O complexo IV (COX) é formado por 13 componentes proteicos, três dos quais codificados pelo mtDNA (subunidades I, II e III) (figura 5). Catalisa a transferência de quatro electrões do citocromo c para o O_2 , reduzindo-o a água.

As subunidades mitocondriais da COX contêm os seguintes centros redox envolvidos na transferência de protões: 2 grupos heme (a e a_3) e dois iões cobre (CuA e CuB). Está bem estabelecido que o fluxo de electrões é efectuado do citocromo c para o centro CuA, seguindo para o heme a , o centro heme a_3 -CuB e finalmente para o oxigénio. Quatro protões são translocados para o lado citosólico da membrana interna da mitocôndria por cada par de electrões que flui através da COX.

O complexo V (ATP sintase, F₀-F₁ ATPase) é constituído por 16 peptídeos, sendo dois de síntese mitocondrial (ATPase6 e ATPase9) (figura 5). Apresenta três porções: F₀, um canal de protões (a unidade condutora de protões), hidrofóbica, que mergulha na membrana interna da mitocôndria, F₁, a unidade catalítica, hidrofílica, que sintetiza ATP a partir de ADP e ortofosfato e duas hastes, uma central e outra lateral, que une F₀ e F₁. As unidades codificadas pelo mtDNA (ATPase 6 e ATPase 8) localizam-se na porção F₀.

A síntese de ATP associa-se à dissipação do gradiente protónico criado pela CRM. A reacção é reversível, podendo haver hidrólise de ATP com utilização da energia libertada na translocação de protões para o espaço intermembranar. A síntese de ATP, a partir de difosfato de adenosina (ADP) e ortofosfato ligados a F₁, é um processo que não consome energia por si mesmo. O papel do fluxo protónico através do complexo V seria o de libertar o ATP da enzima e não propriamente a sua síntese. O principal mecanismo regulador da actividade da ATP sintase é a concentração do substrato (ADP). A enzima pode ser estimulada ou inibida de acordo com as necessidades energéticas da célula (Das AM, 2003). Durante a privação de O_2 ou em outras condições em que o potencial de membrana diminua, a ATP sintase pode mantê-lo à custa da hidrólise de ATP associada a transporte de protões para o espaço intermembranar. Este mecanismo tem a vantagem de manter o potencial eléctrico necessário nomeadamente à importação mitocondrial de proteínas. O sistema é limitado pela proteína inibidora (IF₁), que se liga a F₁ a valores baixos de pH na matriz mitocondrial, inactivando-o.

Os complexos da CRM organizam-se em estruturas supramoleculares, supercomplexos, também designados por respirassomas. Para o sistema de fosforilação oxidativa humano foram propostos dois supercomplexos: o maior, formado por um complexo I, dois complexos III e quatro complexos IV (I1, III2 IV4) e o outro constituído por dois complexos III e quatro complexos IV (III2 IV4). Aqueles supercomplexos acompanhavam-se de um complexo II monomérico e de um complexo V dimérico, na proporção de 2:1:3:3. A formação dos supercomplexos teria vantagens funcionais, nomeadamente o

direcionamento dos substratos, evitando a competição com outras enzimas, o reforço catalítico, diminuindo o tempo de difusão dos substratos, o sequestro de ROS, como a semi-ubiquinona, e a estabilização dos complexos individuais (Schägger, 2002).

A maior parte do ATP produzido pela ATP sintase é transportada para fora da mitocôndria através do ANT₁, o transportador de nucleótidos de adenina. A disponibilidade de ADP é essencial para o funcionamento da CRM /fosforilação oxidativa, sendo o quociente [ADP] / [ATP] um dos principais factores de controlo da síntese de ATP. O ATP tem uma semi-vida intracelular muito curta, sendo imediatamente utilizado para as funções celulares dependentes de energia, ou armazenado sob a forma de fosfocreatina. O ATP transfere para a creatina a ligação fosfato de alta energia, através da reacção catalisada pela creatina cinase (CK).

O sistema da creatina actua como uma reserva de energia de mobilização rápida em todas as células, nomeadamente a nível cerebral e muscular, através da reacção inversa, também catalisada pela CK. As células captam a creatina circulante através de um transportador específico e armazenam-na sob a forma de fosfocreatina, por acção da CK e ATP. Este processo é extremamente importante no músculo, onde se encontra cerca de 94% da creatina total (Wyss e Kaddurah-Daouk, 2000).

Função termogénica - Uma das múltiplas funções da mitocôndria é a manutenção da temperatura corporal nos animais endotérmicos, como o homem. A produção de calor deve-se ao desacoplamento entre a CRM e a síntese de ATP por acção de uma proteína de transporte de protões da membrana interna da mitocôndria, a termogenina ou UCP1 (*Uncoupling protein1*). A UCP1 promove a reentrada dos protões na matriz mitocondrial a partir do espaço intermembranar, permitindo que a energia armazenada pelas bombas de protões se dissipe sob a forma de calor, em resposta à lipólise induzida pela noradrenalina. A UCP1 pertence a uma família da qual se conhecem mais quatro elementos (UCP2-5). O papel termogénico está bem estabelecido apenas para a UCP1 (Jezek et al., 2004; Erlanson-Albertsson, 2003). O tecido adiposo castanho, especializado na termogénese, é muito vascularizado e rico em mitocôndrias e em UCP1. Nos recém-nascidos constitui 5% da massa corporal e é extremamente importante na adaptação à vida extra-uterina e na resistência à hipotermia. É praticamente inexistente nos adultos (Symonds et al., 2003; Klingenspor, 2003). A dissipação de energia sob a forma de calor ocorre em todas as células, nomeadamente na adaptação ao frio, mas a mediação molecular da mesma é controversa, já que a UCP1 se expressa apenas no tecido adiposo castanho (Hagen e Vidal-Puig, 2002; Andrews et al., 2005).

O desacoplamento entre a CRM e a fosforilação oxidativa ocorre igualmente com a ruptura da membrana interna da mitocôndria provocada por um detergente ou acção mecânica. O mesmo acontece (com manutenção da estrutura mitocondrial) por acção de substâncias lipossolúveis que, como o 2,4-dinitrofenol (DNP) e outros compostos

aromáticos ácidos (FCCP –carbonilcianeto de p-trifluorometoxi-fenilhidrazona e m-CCP-carbonilcianeto de m-clorofenilhidrazona), podem transportar prótons através da membrana interna da mitocôndria (Stryer, 1995). Também ionóforos como a valinomicina promovem o desacoplamento, ao dissiparem o potencial de membrana da membrana interna da mitocôndria. Estas substâncias desacopladoras são muito importantes no estudo laboratorial das funções mitocondriais (Rustin et al., 1994).

2.2.4 Dupla regulação genética da mitocôndria

Ao contrário de todos os outros organelos celulares, as mitocôndrias têm uma dupla regulação genética, uma vez que contêm ácido desoxirribonucleico próprio, o mtDNA. Como se ilustra na figura 5, a participação deste é muito pequena em termos quantitativos (13 polipeptídeos codificados pelo mtDNA contra mais de 1000 proteínas diferentes de origem nuclear). No entanto, o seu papel é extremamente importante (DiMauro 2006c; MITOMAP, 2008). A presença intracelular do mtDNA é o mais importante argumento a favor da teoria endossimbiótica, isto é, de que as mitocôndrias descenderiam de bactérias aeróbias que colonizaram células eucariotas, glicolíticas, há 1,5 bilhões de anos (Ruiz-Pesini et al., 2006).

Os genes nucleares relacionados com as mitocôndrias podem assim subdividir-se em quatro grupos: os que codificam componentes estruturais da CRM, os que codificam factores de *assembling* dos complexos enzimáticos da CRM; os responsáveis pela estabilidade do mtDNA e os envolvidos na biogénese da mitocôndria (Zeviani e Carelli, 2003).

Quase todas as proteínas mitocondriais são codificadas pelo nDNA, sintetizadas no citosol como proteínas precursoras e subsequentemente importadas para os vários locais das mitocôndrias. A importação mitocondrial é um processo complexo dependente de translocases (TOM- *Translocase of the Outer Membrane* e TIM- *Translocase of the Inner Membrane*) e de outros complexos proteicos envolvidos na topologia das proteínas dentro da mitocôndria (Chacinska e Rehling, 2004). As proteínas precursoras contêm, na maior parte dos casos, sequências de sinalização, cliváveis por peptidases. São acompanhadas no seu percurso por factores citosólicos e mitocondriais, *chaperones*, que impedem a sua agregação e mantêm a sua conformação proteica (ex: Hsp70 – *chaperon* citosólico ou proteína do choque térmico e a MSF - *mitochondrial importing stimulating factor*). As referidas sequências de sinalização interagem com receptores mitocondriais específicos, de modo a que as proteínas sejam translocadas para dentro da mitocôndria (Neupert, 1997; Truscott et al, 2003). A translocação é dependente do potencial de membrana mitocondrial (Baker et al., 2007).

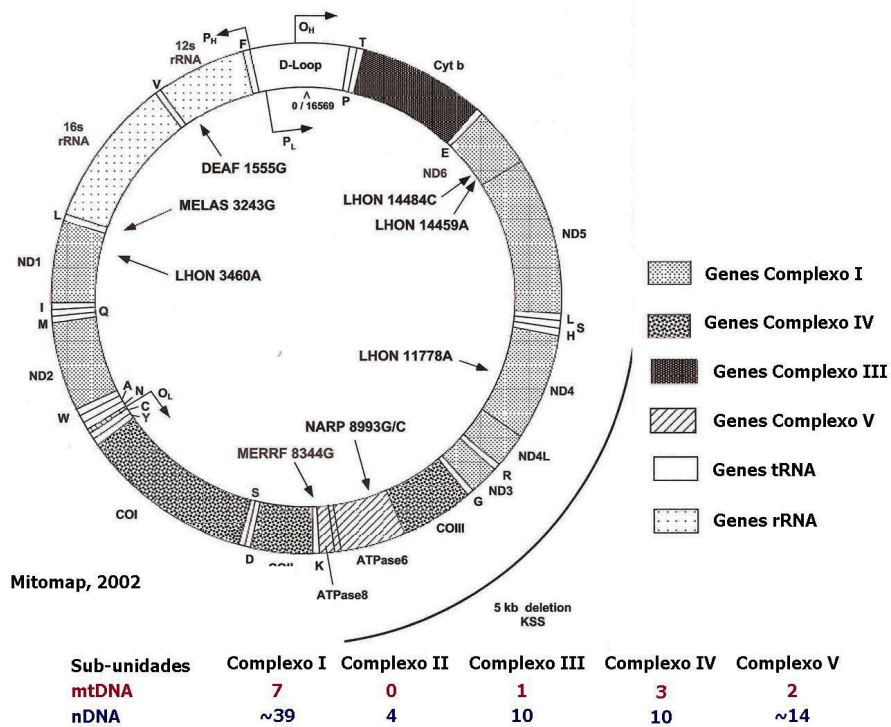


Figura 5 - Dupla regulação genética da mitocôndria

Esquema do mtDNA e distribuição dos genes codificantes das subunidades dos complexos da CRM.

Os genes que codificam proteínas, sete subunidades do complexo I (*ND*), três subunidades da citocromo oxidase (*COX*), o citocromo b, subunidade do complexo III (*Cyt b*) e duas subunidades da ATP sintase (*6* e *8*) estão representados a sombreados variados. Dos genes que codificam componentes envolvidos na síntese proteica, os 22 genes do RNA de transferência mostraram-se branco e os RNAs ribossômicos 12S e 16S estão representados a ponteados claros. A região da ansa D (D-loop) controla a iniciação da replicação e transcrição do mtDNA.

(adaptado de MITOMAP, 2008 e de DiMauro e Schon, 2006)

Para além das subunidades dos complexos enzimáticos do sistema da fosforilação oxidativa, dos *chaperones* e dos transportadores, o núcleo contribui com muitos outros agentes para o normal funcionamento da mitocôndria, nomeadamente factores de montagem (*assembling factors*), como as proteínas codificadas pelo *NDUFAF1* e pelo *SURF1* para os complexos I e IV, respectivamente (Pérez-Martínez et al., 2008; Fernández-Vizarra et al., 2009).

A replicação e a manutenção do mtDNA estão igualmente dependentes do nDNA, uma vez que os factores que as controlam são codificados por genes nucleares (*DGUOK*, *POLG1*, *Twinkle*, *ANT1*...). A *comunicação* entre os dois genomas é um processo complexo e ainda mal elucidado (Spinazzola e Zeviani 2005).

Como ilustrado na figura 5, o mtDNA humano é uma molécula dupla, circular, de 16,6 kilobases, com duas cadeias complementares: leve e pesada, L e H, respectivamente de *light strand* e de *heavy strand*. Contém 37 genes que codificam 13 polipeptídeos constituintes dos complexos I (ND1-6, ND4L), III (citocromo b), IV (COX I-III) e V

(ATPase 6 e 8) da CRM, dois ácidos ribonucleicos (RNA) ribossômicos e 22 RNA de transferência para a sua expressão. Todas as sequências codificantes são contínuas, sem separação por intrões (Zeviani e Carelli, 2003). Possui ainda uma região de 1121pb que regula a transcrição e replicação do mtDNA, a ansa D (DiMauro e Schon, 2006; Ruiz-Pesini et al., 2006).

O mtDNA corresponde a cerca de 1% do DNA total. As mitocôndrias são poliplóides, contendo 2-10 cópias de mtDNA por organelo. Cada célula contém centenas de mitocôndrias e conseqüentemente até vários milhares de cópias de mtDNA. Num indivíduo saudável, todas as cópias do mtDNA são idênticas, situação referida como homoplasmia (Schapira, 2006).

A divisão mitocondrial e a replicação do mtDNA são independentes do ciclo celular. Na divisão celular vai assim haver segregação mitótica, isto é, cada célula filha receberá um lote variável de mitocôndrias e de cópias do mtDNA (figura 6).

A replicação do mtDNA inicia-se em dois locais distintos, primeiro a nível da cadeia H, mais precisamente na região O_H (origem da cadeia H) designada por ansa D (D-loop: *displacement loop*), no sentido dos ponteiros do relógio. Dá-se depois a replicação da cadeia L, em sentido contrário. A transcrição é feita em bloco e não de cada gene separadamente, como acontece com o nDNA, isto é, todos os genes são sintetizados inicialmente como dois transcritos gigantes policistrônicos, um codificado pela cadeia H e outro pela cadeia L. Os mtRNA mensageiros e de transferência são posteriormente clivados e modificados de modo a promoverem a síntese dos peptídeos codificados pelo mtDNA.

O código genético mitocondrial é diferente do nuclear. Ao longo da evolução simbiótica, o mtDNA (das bactérias primitivas) foi sendo englobado pelo núcleo, pelo que a maioria dos genes mitocondriais está presente no núcleo. Essa transferência ainda continua, mas as alterações ao código genético do mtDNA (que surgiram antes da linhagem fungo-animal) tornam as transferências mais recentes ininteligíveis para a síntese proteica citosólica. Estes genes são designados por pseudogenes (NUMTs- *Nuclear mitochondrial DNA sequences*) e localizam-se tipicamente em regiões não codificantes do nDNA. A existência de pseudogenes mitocondriais no núcleo levanta questões práticas porque, se inadvertidamente amplificados por *polymerase chain reaction* (PCR) e sequenciados, as suas variantes podem ser tomadas por mutações do mtDNA (Woischnik e Moraes, 2002).

O mtDNA tem uma taxa de mutação dez vezes superior ao nDNA (Finisterer, 2006). Pensa-se que a elevada taxa de mutações (polimorfismos – mutações adaptativas e neutras - e mutações patogénicas) seja devida à sensibilidade do mtDNA à lesão oxidativa por ROS formadas na matriz como subproduto da fosforilação oxidativa. Ao contrário do nDNA, o mtDNA não está protegido por histonas, não sofre recombinação durante a meiose, nem teria mecanismos de reparação eficazes (Scheffler, 2001). No entanto, foi recentemente demonstrado que as mitocôndrias de mamífero têm

mecanismos de reparação do DNA semelhantes aos nucleares (Mason e Lightowlers, 2003).

De qualquer modo, o mtDNA é altamente polimórfico, com várias diferenças de sequência entre indivíduos do mesmo grupo étnico e ainda mais entre grupos étnicos diferentes. Estas diferenças permitem definir haplótipos do mtDNA, baseados em padrões específicos de polimorfismos. Os haplótipos parecem influenciar o processo de envelhecimento, a susceptibilidade a determinadas doenças e mesmo a expressão clínica de algumas mutações do mtDNA. O seu conhecimento possibilita seguir movimentos migratórios de grupos étnicos (Wallace et al, 1999; Pereira et al., 2005).

Em caso de mutação do mtDNA podem coexistir na mesma célula cópias de mtDNA normal e mutadas (heteroplasmia). A segregação mitótica pode não ser completamente aleatória e haver uma selecção activa que elimine ou concentre o mtDNA mutante: haverá assim défice da CRM e fosforilação oxidativa nuns tecidos e não noutros. Para que um órgão ou tecido apresente alterações funcionais significativas deverá atingir um certo nível de mtDNA mutado, o chamado *efeito limiar* (figura 6).

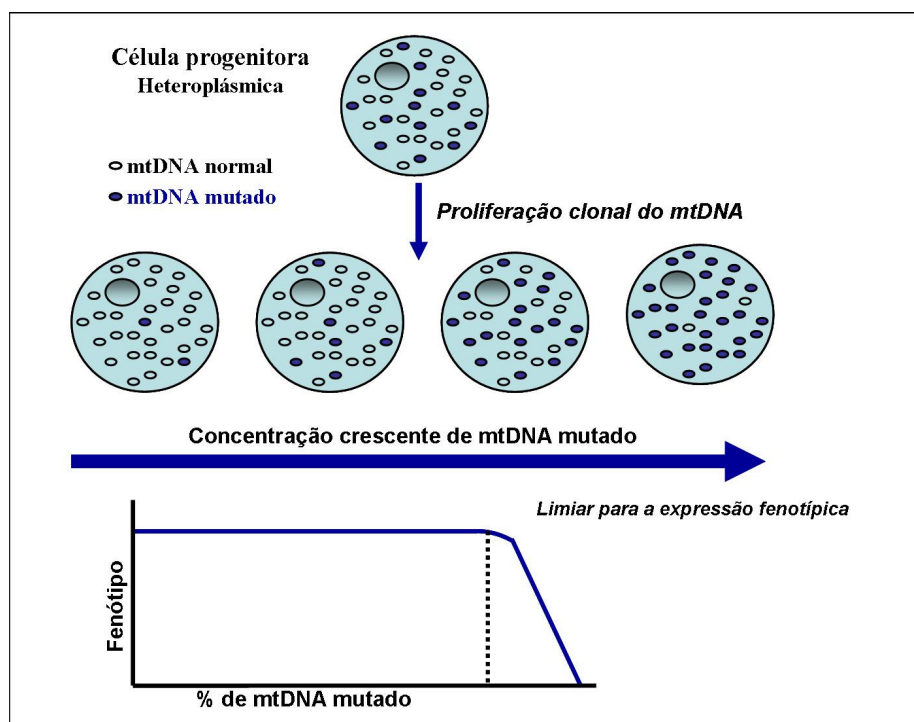


Figura 6 - Segregação mitótica das mitocôndrias durante a divisão celular.

A segregação mitótica das mitocôndrias pelas células filhas produz uma grande variedade de genótipos, desde quase todas normais até quase todas mutadas. A partir de um certo nível de cópias de mtDNA mutado surgem manifestações clínicas (efeito limiar).

(adaptado de Shoffner e Wallace, 1995)

Aquele efeito dependerá da mutação e da dependência energética do tecido em causa, bem como da fase de desenvolvimento do indivíduo e do ambiente genético (mitocondrial e nuclear) e somático (Shoffner e Wallace, 1995).

As mitocôndrias são herdadas exclusivamente da mãe. Uma mutação do mtDNA será transmitida a todos os filhos e filhas, mas só estas a passarão aos descendentes. Embora as mitocôndrias paternas entrem no ovócito durante a fertilização, são selectiva e precocemente destruídas (Sutovsky et al., 2004).

Durante a ovogénese verifica-se um efeito de *gargalo* na medida em que apenas cerca de 1% das mitocôndrias maternas do ovócito passam para o embrião inicial, o que se designa por *gargalo genético*. Destas, só as centrais farão parte do embrião: *gargalo somático*. Assim, a probabilidade de transmitir uma mutação do mtDNA de um único genoma mitocondrial é baixa. O grau de transmissão dum alteração do mtDNA para a geração seguinte é imprevisível (Thorburn e Dahl, 2001).

2.2.5 Stress oxidativo, apoptose e envelhecimento

Stress oxidativo e mitocôndria - Responsáveis por cerca de 90% do consumo celular de oxigénio, as mitocôndrias são uma importante fonte intracelular de ROS, estimando-se que, em condições fisiológicas, até 0,1 a 5% do oxigénio consumido seja incompletamente oxidado e convertido em ROS (Kang e Hamasaki, 2005). A redução do oxigénio passa por vários intermediários altamente reactivos. O radical livre de oxigénio a formar-se primeiro na mitocôndria é o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que se transforma em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) espontaneamente ou por acção da superóxido-dismutase (SOD). O H_2O_2 , na presença de iões metálicos como o ferro, pode transformar-se em radicais hidroxilo (OH.) pela reacção de Fenton. Dentro da mitocôndria será pouco provável que tal aconteça devido à ligação dos iões por proteínas da matriz (Brookes 2004). Os principais locais de produção de OH. na mitocôndria são os complexos I e III. Os peróxidos lipídicos, formas aciladas do H_2O_2 , são um outro importante grupo de ROS produzidas na mitocôndria, ocorrendo a nível dos complexos I e III. A peroxidação lipídica é iniciada pela desprotonação de fosfolípidos insaturados pelo Fe^{2+} livre, previamente reduzido a nível da CRM e não pelo $O_2^{\cdot-}$ (Kang e Hamasaki, 2005). A produção de $O_2^{\cdot-}$ e de peróxidos lipídicos é iniciada pela libertação de electrões da CRM, o que ocorre com maior intensidade quando a CRM está num estado muito reduzido, tal como acontece quando é bloqueada (Kang e Hamasaki, 2005). O potencial de membrana é um importante modulador da produção de ROS. Por outro lado, as ROS podem estimular o desacoplamento mitocondrial.

As ROS têm sido consideradas subprodutos da respiração celular responsáveis pela lesão oxidativa de macromoléculas como os ácidos nucleicos, as proteínas e os lípidos,

contribuindo para o envelhecimento (Harman, 2003). O mtDNA, que se replica continuamente, mesmo em células diferenciadas pós-mitóticas como os neurónios e os miócitos, é um alvo importante da lesão pelas ROS. Estas levam à rotura das cadeias e modificações das bases, entre as quais se destaca a guanina, que é transformada em 8-oxoguanina e originam várias mutações (A:T → C:G e C:G → T:A).

Foi demonstrado que o O_2^- externo pode gerar potencial de membrana e a síntese de ATP, através da redução do citocromo c do espaço intermembranar, que passaria os electrões ao complexo IV, constituindo assim a mitocôndria um local de varrimento de ROS. Tem igualmente sido reconhecida a importância das ROS na sinalização celular, em processos como a proliferação celular e a apoptose, entre outros (Brookes, 2004).

Papel na apoptose e envelhecimento - A apoptose é uma forma de morte celular programada, diferente da necrose, útil para remover células indesejadas ou lesadas. Trata-se de um processo que envolve a mitocôndria e o retículo endoplásmico e em que um grupo de cisteína-proteases (caspases) é activado através de uma cascata de sinalização que leva à degradação do nDNA e à morte celular. Estudos em mitocôndrias isoladas demonstraram que em condições de baixa concentração de ATP, elevação do cálcio citosólico ou aumento da produção de ROS, o ANT1 da membrana interna da mitocôndria e outras proteínas da membrana externa da mitocôndria, como o canal aniónico dependente de voltagem (VDAC) e o receptor periférico de benzodiazepinas, sofrem uma alteração conformacional, transformando-se no poro de transição mitocondrial (MTP-*mitochondrial transition pore*), zona de contacto e abertura entre as membranas interna e externa da mitocôndria. Este poro, cuja formação pode ser activada e inibida por um grande número de estímulos, permite a dissipação do potencial de membrana e do gradiente de pH, a libertação do citocromo c e de outros factores promotores da morte celular, como o factor de iniciação da apoptose (AIF-*Apoptosis Initiating Factor*) e a DNase activada por caspase (CAD- *Caspase Activated DNase*), para o citosol. Com a abertura do referido poro, os iões equilibram-se entre a mitocôndria e o citosol, causando intumescência da mitocôndria e consequente ruptura da membrana externa da mitocôndria (Peter et al., 1997; Crompton, 1999; Hengartner, 2000; Raha e Robinson, 2001; Brookes et al., 2004).

A adaptação da função mitocondrial vai ocorrendo constantemente ao longo do desenvolvimento. Os embriões humanos estão adaptados à produção glicolítica, anaeróbia, de energia, adquirindo gradualmente a capacidade de metabolismo aeróbio, oxidativo, durante o desenvolvimento pré e pós implantação (Clough, 1985). No desenvolvimento pré-natal podem distinguir-se três fases: *fase ovárica*, glicolítica, correspondente à biogénese das mitocôndrias; *fase uterina*, oxidativa, em que no embrião há uma mudança do metabolismo anaeróbio para o aeróbio (acompanhada pela expressão dos genes codificados pelo mtDNA e declínio dos genes glicolíticos) e *fase*

perinatal, com a replicação do mtDNA, relacionada com o aumento dos níveis de oxigénio associados ao nascimento (Knudsen e Green, 2004).

A mitocôndria tem sido largamente implicada no processo de envelhecimento, pelo facto de ser o maior produtor de *ROS*, envolvidos como intermediários ou subprodutos da apoptose. É costume dizer-se que com a idade vamos ficando *enferrujados*. A sabedoria popular postulou há muito a teoria mitocondrial do envelhecimento! Estão bem documentados o papel do ferro na produção de *ROS* e a acumulação de mutações do mtDNA com o envelhecimento, bem como a implicação patogénica das mitocôndrias em doenças com ele associadas (Grazina et al., 2006; Kujoth et al., 2006).

2.3 As doenças da cadeia respiratória mitocondrial

2.3.1 Definição e manifestações clínicas

O conceito de DCRM, citopatias mitocondriais ou doenças da fosforilação oxidativa tem limites difíceis de definir devido à grande variabilidade de quadros clínicos, à não uniformidade de critérios de diagnóstico e à existência de frequentes alterações secundárias da fosforilação oxidativa. Muitas outras doenças e fármacos ou tóxicos podem cursar com ou estar na origem de alterações secundárias da fosforilação oxidativa e até do mtDNA (Maurer e Moller, 1997; Modica-Napolitano et al., 2003; Haugaard et al., 2005). O mesmo tipo de alterações pode igualmente contribuir para a patogénese de doenças poligénicas como a diabetes *mellitus* e outras (Wardell et al., 2003; Brealey et al., 2002; Kang et al., 2005; Enns et al., 2003; Svistunencko et al., 2006; Grazina et al., 2006). Nesta linha, em 2000, Leonard e Shapira subdividiram as DCRM em duas classes: I e II. A classe I engloba as doenças resultantes de mutações do mtDNA ou do nDNA que codificam subunidades dos complexos enzimáticos da CRM e da fosforilação oxidativa, isto é, doenças congénitas; as doenças da classe II resultam da mutação de genes nucleares que codificam outras proteínas mitocondriais e/ou de toxinas (exógenas ou endógenas) e são predominantemente neurodegenerativas (Leonard e Schapira, 2000). Mesmo o conceito de doença mitocondrial como erro inato do metabolismo é ainda lato, uma vez que engloba muitas outras doenças monogénicas, incluindo outros defeitos enzimáticos mitocondriais que afectam indirectamente a fosforilação oxidativa (Schapira 2002; Enns et al., 2003; Schwab et al., 2006).

As doenças primárias da fosforilação oxidativa, que se designarão por DCRM, podem ser definidas como doenças monogénicas da CRM devidas a uma mutação patogénica bem definida do mtDNA ou nDNA ou a um défice significativo da CRM de presumível base monogénica, isto é, primário e não secundário a uma outra doença (Naviaux, 2004; Schaefer, 2004). Neste contexto, a ataxia de Friedreich, que se tem situado numa zona fronteira da definição, deveria ser considerada uma DCRM, uma vez que a alteração no gene da frataxina afecta a estrutura e função dos complexos I, II e III (DiMauro e Rustin, 2009).

O primeiro doente com uma doença da fosforilação oxidativa foi descrito por Luft em 1963, embora já anteriormente fossem conhecidos casos de acidose láctica hereditária. Curiosamente, tratava-se de um caso de hipermetabolismo causado por um desacoplamento entre o transporte de electrões e a síntese de ATP (Luft et al., 1962). Apesar de só estar referido na literatura apenas mais um caso de doença de Luft, a investigação do caso inicial é um marco histórico no reconhecimento das DCRM (DiMauro et al., 1976).

Inicialmente consideradas miopatias ou encefalomiopatias, as DCRM podem originar qualquer sintoma, em qualquer órgão ou tecido, em qualquer idade (Shy e Gonatas, 1964; Willis et al., 2000; McFarland et al., 2002; Barclay et al., 2005; Munnich, 2006). Apesar de afectarem predominantemente os órgãos de maior consumo energético como o sistema nervoso (central e periférico) e o músculo (incluindo o cardíaco), as DCRM podem atingir o sistema hematopoiético, o fígado e o pâncreas, entre outros, isoladamente ou em associação, originando quadros multissistémicos. Ao contrário da maior parte das outras doenças hereditárias do metabolismo, as DCRM têm muito frequentemente início na idade adulta (Naviaux, 2004).

Clínica multissistémica - As DCRM são intrinsecamente doenças multissistémicas, dado a universalidade do uso do ATP nos sistemas biológicos e o facto de mais de 95% do ATP ser produzido na mitocôndria (Figura 7). Manifestam-se frequentemente nos primeiros tempos de vida, incluindo o período pré-natal, devido às elevadas necessidades energéticas decorrentes do crescimento (Sue et al., 1999). Traduzem-se por alterações musculares, neurológicas, endocrinológicas, gastrointestinais, hematológicas, renais e/ou psiquiátricas (Munnich et al., 2001, Hirano et al., 2006). Um dos dados orientadores do diagnóstico clínico é o envolvimento de um número crescente de órgãos durante a evolução (Almeida et al., 2004). Munnich sistematiza a clínica das DCRM em subgrupos, que se sobrepõem: neurológica, muscular, cardíaca, renal, nutricional, hepática, endócrina, hematológica, otológica, oftalmológica, dermatológica e morfológica (Munnich et al., 2001).

Clínica neuro-psiquiátrica - Nas DCRM o atingimento do sistema nervoso central (SNC) e/ou periférico é frequente no início da doença e quase constante nos estádios finais de evolução. Pode ocorrer logo no período neonatal com um quadro de encefalopatia aguda com acidose láctica, indistinguível da sepsis, por vezes com sinais de sofrimento pré-natal que dificultam o parto (Garcia et al., 2005). A clínica de encefalopatia aguda ou crónica pode ter início após um período variável de neurodesenvolvimento normal ou quase normal e traduzir-se por regressão psicomotora, com ou sem convulsões (Diogo et al., 2005). Praticamente todos os sinais de sofrimento do SNC podem estar presentes em várias combinações, tais como: hipotonia, sinais do tronco cerebral (oftalmoplegia, alteração dos movimentos oculares e apneias recorrentes), ataxia cerebelosa, convulsões, mioclonias, síndrome piramidal ou extrapiramidal e neuropatia periférica (Pereira et al., 2007). O atingimento do sistema nervoso periférico seria particularmente frequente na apresentação no adulto (Fisnterer et al., 2001; Hays et al., 2006).

As manifestações clínicas das DCRM abrangem igualmente alterações do foro psiquiátrico/ neuropsicológico como depressão, alterações da concentração e do

raciocínio, alucinações, alterações da personalidade, autismo, atraso mental, regressão do neurodesenvolvimento e demência, entre outros (Turconi et al., 1999; Graf et al., 2000; Jaksch et al., 2001; Oliveira et al., 2005; Finsterer, 2006; DiMauro et al., 2006a). É frequente haver prostração e agravamento do quadro neurológico durante as intercorrências infecciosas, nomeadamente nas crianças (Wolf e Smeitink, 2002).

Clínica muscular - As formas miopáticas da DCRM são caracterizadas por fraqueza progressiva e hipotonia, com intolerância ao esforço e atrofia muscular. O lactato plasmático é normal ou moderadamente elevado, mas pode aumentar significativamente com o exercício físico (Artuch et al., 1998b; Finsterer e Milvay, 2002). O aumento da CK não é típico das miopatias mitocondriais, ocorrendo ocasionalmente (Spinazzola e Zeviani, 2005). Nos primeiros meses, o envolvimento muscular pode manifestar-se por uma hipotonia global, que contrasta com a aparente normalidade das restantes aquisições do neurodesenvolvimento e que pode ser difícil de distinguir clinicamente da hipotonia de origem central (Grazina et al., 1999). A manifestação mais grave é a miopatia letal infantil, com acidose láctica e insuficiência respiratória, de evolução multissistémica, fatal antes do ano de idade (Shofner e Wallace, 1995; Bernier et al., 2002). Foram descritas formas de hipotonia neonatal transitória por défice do complexo IV (DiMauro et al., 1983; Wada et al., 1996). Menos habitual nas DCRM, são crises de rabdomiólise com mialgia e mioglobínúria (de Lonlay-Debeney et al., 1999; Kollberg et al., 2005).

Clínica cardíaca - O envolvimento cardíaco nas DCRM traduz-se mais frequentemente por miocardiopatia, sendo mais raros a não compactação do ventrículo esquerdo e as arritmias. A miocardiopatia, com ou sem insuficiência cardíaca, pode surgir isolada ou associada a outras manifestações clínicas, como forma de apresentação ou no decorrer da evolução. É mais frequentemente hipertrófica, mas pode ser também dilatada (Vilarinho et al., 1997a; Tessa et al., 1999; Towbin, 2006; Estevinho et al., 2008). A histologia mostra muitas vezes fibrose intersticial ou fibroelastose. O lactato plasmático estaria elevado nas formas neonatais, podendo ser normal nas tardias (Munnich et al., 2001).

Mutações no gene da tafazina (*TAZ*) estão na base da síndrome de Barth, de outras miocardiopatias não sindrómicas e de casos de não compactação do ventrículo esquerdo ligados ao cromossoma X (Spencer et al., 2006).

O lugar das DCRM na etiologia das miocardiopatias está por definir. A avaliação sistemática dos casos sem causa conhecida através do estudo mitocondrial em biópsia endomiocárdica poderá contribuir para o esclarecimento deste ponto, já que estão descritos doentes com DCRM limitada ao miocárdio (Rustin et al., 1993).

Alterações do ritmo e da condução cardíaca são típicas da síndrome de Kearns-Sayre (KSS) e da LHON, embora possam surgir noutros contextos clínicos (Nikoskelainen et al., 1994; Chawla et al., 2008).

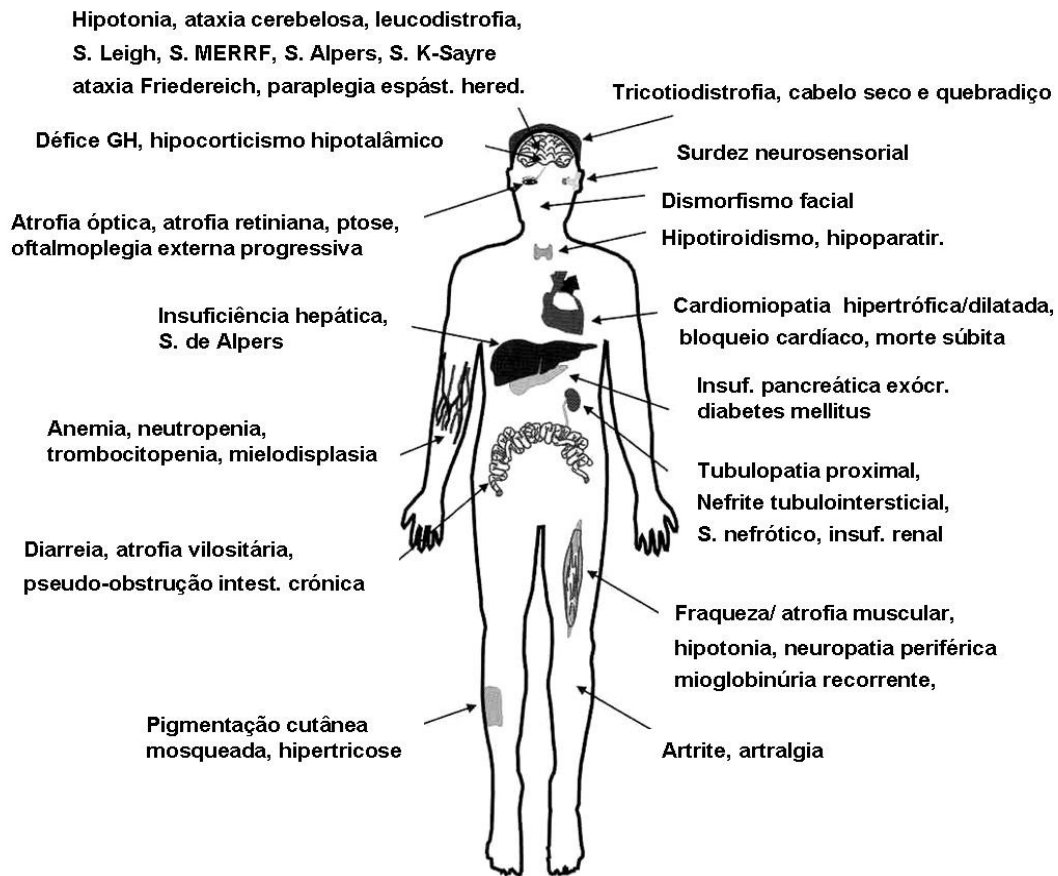


Figura 7 - Diversidade da apresentação clínica das DCRM.

(adaptado de Munnich et al., 2001)

Clínica renal - As manifestações renais das DCRM não são raras na criança. Começam habitualmente nos primeiros dois anos de vida, sendo o quadro mais característico a tubulopatia proximal, que pode ser incompleta (Morris et al., 1995). Pode ocorrer também doença glomerular, traduzida por síndrome nefrótica ou nefropatia tubulointersticial crónica. Na experiência de Munnich, a clínica renal associa-se habitualmente a lactato plasmático normal, mas pode haver hiperlactacidúria ou presença de intermediários do ciclo de Krebs na urina (Munnich et al., 2001).

Clínica digestiva e nutricional - O atraso de crescimento ponderal e estatural nas crianças com DCRM, nem sempre explicado por outros sintomas associados nomeadamente digestivos, é muito frequente e pode ser de início pré-natal (Munnich et

al., 1996; Bernier et al., 2002). Uma inflexão não explicada das curvas de crescimento pode ser a única manifestação da doença durante algum tempo. São também possíveis vômitos recorrentes, diarreia crónica com atrofia vilositária e/ou insuficiência pancreática exócrina, que põem como diagnósticos diferenciais a intolerância às proteínas do leite de vaca, a doença celíaca ou a síndrome de Shwachman-Diamond (Cormier-Daire et al., 1994). Os quadros de pseudo-obstrução intestinal crónica fazem parte da síndrome *Mio-Neuro-Gastro-Intestinal Encephalopathy* (MNGIE). A hipocitrulinémia seria um marcador das DCRM com atingimento do intestino delgado, tal como de outras doenças congénitas ou adquiridas que cursam com redução da massa intestinal (Parfait et al., 1999; Crenn et al., 2008; Atkuri et al., 2009).

Os sintomas gastrointestinais podem melhorar ou desaparecer com o tempo, à medida que surge a afecção de outros órgãos (McShane et al., 1991).

Clínica hepática - As DCRM são uma importante causa de insuficiência hepática grave na criança. Segundo Munnich é possível distinguir dois subgrupos, de acordo com o curso clínico: forma neonatal, severa (40%), de início na primeira semana de vida e atingimento neurológico (hipotonia grave, epilepsia mioclónica e atraso psicomotor) e forma tardia (60%) com início do 2º ao 18º mês de vida, envolvimento neurológico inconstante e evolução por vezes fatal. Em ambos os grupos há esteatose (micro ou macronodular) e cirrose e elevação do lactato no *líquor* ou plasma (Munnich et al., 2001). Alguns destes casos estão associados a depleção do mtDNA (Mancuso et al., 2005).

Clínica endócrina - Nanismo por défice de IgF1, diabetes *mellitus* e hipoparatiroidismo são as manifestações endocrinológicas mais frequentes das DCRM (Yialamas et al., 2006). Hipotiroidismo, défice de ACTH ou insuficiência supra-renal foram igualmente descritos neste contexto (Artuch et al., 1998; Bruno et al., 1998).

A diabetes *mellitus*, tipo I ou II, surge habitualmente no adulto jovem, raramente como forma de apresentação. No entanto, foram descritos casos de diabetes *mellitus* de início neonatal. A diabetes *mellitus* das DCRM está quase sempre associada a surdez e a insuficiência cardíaca ou hepática. Vários adultos jovens com a mutação A3243G, a mais frequentemente associada à síndrome *Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes* (MELAS), apresentaram diabetes *mellitus* e surdez neurosensorial isoladas, sem anticorpos anti-ilhéus (Kadowaki et al., 1994). Num estudo que englobou 550 doentes diabéticos japoneses seleccionados aleatoriamente, foi encontrada a mutação MELAS em 0.9% dos casos e em nenhum caso dos 250 controlos com tolerância normal à glicose (Otabe et al., 1994).

Clínica hematológica - As DCRM podem apresentar-se ou cursar com alterações hematológicas como anemia, neutropenia, trombocitopenia, pancitopenia ou eosinofilia em contexto sindrómico, como por exemplo na síndrome de Pearson, ou não. A mielodisplasia, com sideroblastos em anel e vacuolização dos precursores da medula óssea é característica da PS e da MLASA (*mitochondrial Myopathy, Lactic Acidosis, Sideroblastic Anemia*) (Cormier et al., 1990; Inbal et al., 1995).

Clínica otológica - A surdez neurosensorial, mais frequentemente sindrómica, pode ser manifestação de DCRM. A surdez não sindrómica está associada a mutações específicas do mtDNA (T7445C ou A1555G). A mutação A1555G, em particular, confere uma maior sensibilidade ao efeito ototóxico dos aminoglicosídeos, respondendo por 15% de todos os casos de surdez associada àqueles fármacos. No entanto, aquela exposição não é indispensável para que a surdez ocorra (Chinnery, 2006b). A surdez associada a mutações do mtDNA é rara na criança (Tessa et al., 2001).

Clínica oftalmológica - As manifestações oftalmológicas são muito numerosas, ocorrem frequentemente no decurso da doença, podendo fazer parte de síndromes. Degeneração retiniana, atrofia óptica, cataratas, opacidade córnea, estrabismo, oftalmoplegia externa ou total são manifestações possíveis. O nistagmo e o estrabismo são particularmente frequentes na criança, enquanto a oftalmoplegia externa é típica do adulto (Vilarinho et al., 1998; Carelli et al., 2006; Rose et al., 2008; Grazina et al., 2008).

Clínica dermatológica - As alterações da pele e fâneros surgem em associação com outras manifestações. Pigmentação mosqueada das áreas expostas à luz, acrocianose, alopecia, *pili torti* e *trichorexis nodosa*, queratodermia palmoplantar, nevus epidérmico, ictiose e colesteatoma foram descritos em alguns doentes (Bodemer et al., 1999).

Clínica pré-natal - As DCRM não são uma causa comum de malformações. No entanto, fácies invulgar semelhante à da síndrome fetal alcoólica, microcefalia pré-natal, alterações da forma e implantação dos pavilhões auriculares, mãos curtas, braquidactilia e hipoplasia das unhas, bem como a associação VACTERL (anomalias Vertebrais; atresia Anal; defeito Cardíaco: comunicação interventricular; fístula Traqueo-Esofágica, com atresia do esófago; anomalias Renais; alteração dos membros - *Limb*: displasia radial) foram descritos associados a DRCM (von Kleist Retzow et al., 2003; Damian et al., 1996). De entre as manifestações pré-natais mais frequentes, conta-se a restrição de crescimento intra-uterino isolada ou associada a outras anomalias, como polihidrâmnios, miocardiopatia hipertrófica, alterações do ritmo cardíaco e hidronefrose (Gibson et al., 2008).

Síndromes mitocondriais - A maior parte das DCRM foram identificadas e sistematizadas por neurologistas e oftalmologistas de adultos. Foram sendo definidas associações de sinais e sintomas característicos (síndromes mitocondriais), habitualmente designadas pelo autor que as descreveu (mesmo antes de se associarem a DCRM) ou por acrónimos, a partir das iniciais das principais manifestações. As síndromes são mais frequentemente observadas em adultos jovens ou adolescentes e estão frequentemente associadas a alteração do mtDNA (figuras 8 e 9).

Apenas algumas das síndromes mitocondriais, como as de Leigh, de Pearson, de Alpers e a de Barth se manifestam tipicamente na infância.

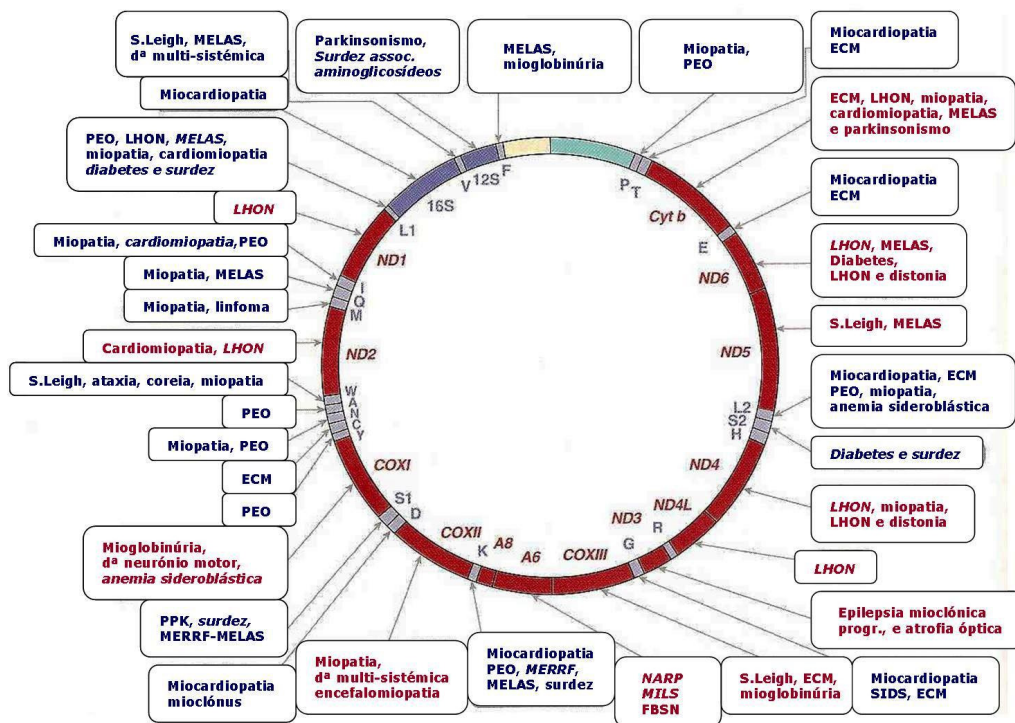


Figura 8 - Mapa de morbilidade do genoma humano mitocondrial.

DNA mitocondrial: genes codificantes de proteínas (a vermelho): sete subunidades do complexo I (ND); três unidades do complexo IV (CO), citocromo b (cyt b) e duas subunidades do complexo V (A6 e A8); dois rRNAs (12S e 16S) e 22 tRNA (identificados pela letra do código do aminoácidos correspondente).

Em itálico- doenças mais frequentemente ou predominantemente associadas com mutação num determinado gene; a azul- doenças da síntese proteica mitocondrial; a vermelho- doenças provocadas por mutações em genes codificantes de proteínas.

ECM- encefalomiopatia; FBSN- necrose estriatal bilateral familiar; PEO- oftalmoplegia externa progressiva PPK- queratoderma palmoplantar SIDS- morte súbita infantil.

(adaptado de DiMauro e Schon, 2006)

Síndrome ou Doença de Alpers (OMIM #203700) - Também conhecida por doença de Alpers-Huttenlocher, é caracterizada por hipotonia muscular, epilepsia refractária, déficit visual, atraso do desenvolvimento psicomotor e do crescimento, hepatopatia (infiltração lipídica e cirrose micronodular) com acidose láctica e vômitos, e atrofia cerebral (gliose, espongirose e perda neuronal). Os poucos casos de causa conhecida são devidos a DCRM. Em alguns doentes foi demonstrado déficit do complexo IV. Recentemente foi identificado uma mutação (G7706A) no gene *COXII* do mtDNA (Simonati et al., 2003). Noutros casos têm sido detectadas mutações no gene da polimerase gama (*POLG1*) (Gordon, 2006; Spinazzola e Zeviani, 2005; Horvath et al., 2006).

Síndrome de Barth (OMIM # 302060) - É de transmissão ligada ao cromossoma X (Xq28). Associa miopatia cardíaca e esquelética, neutropenia, mitocôndrias anormais e acidúria 3-metilglutacónica tipo II. A miocardiopatia é de início pré ou neonatal, com neutropenia cíclica, atraso de crescimento e miopatia. Caracteriza-se por uma evolução rapidamente fatal na maioria dos casos. Está associado com mutações no gene *TAZ*, que codifica para as tafazinas. As tafazinas são uma família de proteínas homólogas das acil-transferases dos fosfolípidos e a sua alteração leva a déficit da síntese de cardiolipina (Barth et al., 1999; Barth et al., 2004; Spencer et al., 2006; Chicco e Sparagna, 2007).

Déficite primário de CoQ (OMIM #607426) - Embora não se possa considerar propriamente uma síndrome mitocondrial no sentido definido anteriormente, o déficit primário de CoQ merece destaque pelas suas implicações terapêuticas. As alterações genéticas subjacentes não são ainda conhecidas na maior parte dos casos. Trata-se de uma doença autossômica recessiva, aparentemente rara. Desde a primeira descrição, em 1989, é já possível distinguir pelo menos cinco variantes clínicas principais: encefalomiopatia com convulsões e ataxia (Ogasahara et al., 1989); doença multissistêmica severa da infância com encefalopatia, hepatopatia e nefropatia (Rotig et al., 2000); síndrome de Leigh, com atraso de crescimento (Van Maldergem et al., 2002); forma predominantemente cerebelosa com ataxia e atrofia cerebelosa (Lamperti et al., 2003) e miopatia isolada (Lalani et al., 2005). Um estudo de 135 doentes com ataxia geneticamente indefinida de início na infância identificou déficit de CoQ em 10% dos casos (Lamperti et al., 2003).

Síndrome de depleção do DNA mitocondrial (OMIM #251880) - A MDS (*Mitochondrial Depletion Syndrome*) é uma doença multissistêmica da infância, autossômica recessiva, habitualmente fatal antes da idade escolar. Atinge predominantemente o fígado, músculo, cérebro e rim, em graus e idades de início variáveis. Distinguem-se três formas hepáticas (neonatal, infantil e pré-escolar) e duas

miopáticas (infantil e pré-escolar). A forma hepática pré-escolar corresponderia à síndrome de Alpers (Nhyan et al., 2005). A síndrome de depleção define-se pela diminuição do conteúdo do mtDNA (baixa da relação mtDNA/nDNA), sem mutações nem rearranjos adicionais (Moraes et al., 1991; Hirano et al., 2001). Na maioria dos casos desconhece-se a base molecular (Carrozo et al., 2003). A forma miopática tem sido associada a mutações do gene da timidina cinase (*TK*) e a hepática a mutações do gene da desoxiguanosina cinase (*DGUOK*) ou do *MPV17* (que codifica para uma proteína da membrana interna da mitocôndria, de função desconhecida) (Saada et al., 2001; Mancuso et al., 2005; Oskoui et al., 2006; Wong et al., 2007). Mutações no gene *SUCLA2*, da succinil- coenzima A (CoA) sintetase, muito mais raras, também foram associadas a depleção do mtDNA (DiMauro e Gurgel-Giannetti 2005).

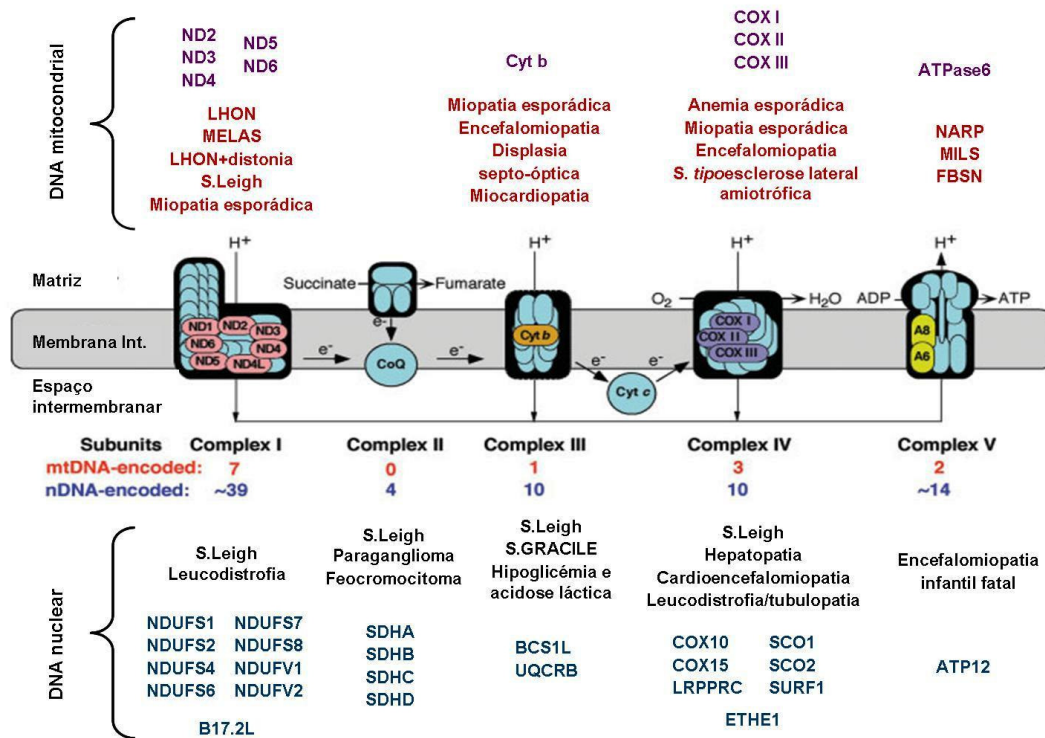


Figura 9 - Doenças da cadeia respiratória mitocondrial com origem no nDNA no mtDNA .

DCRM com origem no mtDNA (acima, a vermelho) e no nDNA (abaixo, a azul) e correlação genótipo – fenótipo, com designação dos genes envolvidos.

(adaptado de DiMauro e Schon, 2006)

Doença ou miopatia mitocondrial letal infantil (OMIM #551000) - LIMD ou LIMM (*Lethal Infantile Mitochondrial Disease/ Myopathy*) é uma entidade que tem início na infância com hipotonia, atraso do neurodesenvolvimento, alteração das provas hepáticas (com extensa esteatose microvesicular e alguma fibrose) e acidose láctica marcada. A evolução é fatal no primeiro ano de vida ou pouco depois (Brown et al., 1992; Gibson et al., 2008).

Neuropatia óptica hereditária de Leber (OMIM #535000) - A LHON (*Leber Hereditary Optic Neuropathy*) é a doença causada por alteração do mtDNA mais frequente, com uma prevalência estimada em 12/100000 habitantes (Man et al., 2003). Afecta predominantemente homens na terceira década de vida e menos frequentemente mulheres ligeiramente mais velhas. Caracteriza-se por atrofia óptica bilateral, sequencial, com perda relativamente rápida, indolor, de visão central, inicialmente num olho, estendendo-se ao outro no intervalo de dias a meses, raramente anos. A visão residual é inferior ou igual a 1/10. A fundoscopia mostra alterações patognomónicas de microangiopatia telangiectásica circumpapilar e edema das fibras nervosas à volta do disco, sem derrame da fluoresceína na angiografia de fluorescência (pseudo-edema). Em alguns casos, há associação com outras manifestações clínicas como arritmias cardíacas, neuropatia periférica ou envolvimento do SNC, nomeadamente lesões da substância branca tipo esclerose múltipla ou do tronco cerebral e do cerebelo. Trata-se de uma doença do mtDNA que afecta subunidades do complexo I. A mutação 11778/ND4 é a mais prevalente, ocorrendo em mais de metade dos casos, e está associada a pior prognóstico da função visual. Outras mutações, menos frequentes, que também afectam subunidades do complexo I codificadas pelo mtDNA são: 3460/ND1 e 14484/ND6 (a menos deletéria, associada à melhor taxa de recuperação da função visual). Há ainda a referir as mutações chamadas secundárias de Leber, polimorfismos encontrados com maior frequências nos doentes com LHON do que na população geral e que teriam um efeito sinérgico. Um outro subgrupo de mutações está associado a doenças relacionadas com a LHON, como a mutação T14459A/ND6 da variante LHON/Distonia/ Síndrome de Leigh. Na maior parte dos casos, as mutações patogénicas de LHON estão presentes em homoplasmia em todos os familiares maternos, mas só alguns (50% dos homens e 10% das mulheres) expressarão a doença, provavelmente por interferência de factores genéticos e/ou ambientais (Carelli, 2002; Man et al., 2002).

Síndrome GRACILE (OMIM #603358) - A designação é um acrónimo de: *Growth Retardation, Aminoaciduria, Cholestasis, Iron overload, Lactacidosis, and Early death*. Também conhecida por síndrome de Fellman, é um dos fenótipos associados ao défice da proteína de *assembling* do complexo III codificada, pelo gene *BCS1L* (Visapää et al., 2002).

Síndrome de Kearns-Sayre - KSS (OMIM #530000) - A síndrome foi descrita por aqueles autores em 1958. É definida pelos critérios de Rowland: oftalmoplegia externa progressiva e retinopatia pigmentar com início antes dos 20 anos, associados a pelo menos uma das seguintes alterações: ataxia, elevação da proteinorráquia (>100mg/dl) e defeito de condução cardíaca (Rowland, 1994). A base molecular mais frequente desta síndrome é a presença de grandes deleções únicas (habitualmente detectáveis no tecido muscular, mas não nos leucócitos) e mais raramente de duplicações ou mutações dos genes do mtDNA que codificam tRNAs (Moraes et al., 1989).

Síndrome de Leigh (OMIM #256000) - A encefalomiopatia subaguda necrotizante, descrita em 1951, é caracterizada por lesões focais, bilaterais e simétricas de degeneração espongiiforme no tronco cerebral, gânglios da base, tálamo, cerebelo, medula e nervos ópticos. Apresenta-se tipicamente na infância, (80% dos casos nos primeiros dois anos de vida) com regressão psicomotora, ataxia e hipotonia e subsequentes sinais de lesão do tronco cerebral (oftalmoplegia, atrofia óptica, ptose, distonia e alterações respiratórias), tendo mau prognóstico. Foram também descritas formas juvenis e do adulto, menos graves (Vilarinho et al., 1997b; Lyon et al., 2006; Finsterer, 2008). Os defeitos da CRM, especialmente défices dos complexos IV e I, estão entre as causas conhecidas da síndrome de Leigh. A maioria seria provocada por mutações em genes nucleares, nomeadamente o gene *SURF1* que codifica um factor de *assembling* do complexo IV (Morris et al., 1996; Zhang et al., 2007). Num subgrupo significativo de casos têm sido identificadas mutações do mtDNA, designadamente nos genes da ATPase6, do ND5 do complexo I ou do tRNA (Lys): MILS - *Maternally Inherited Leigh Syndrome* (Vilarinho et al., 2000; Tsao et al., 2003; Zhang et al., 2007; Finsterer, 2008). Os défices da piruvato-desidrogenase encontram-se entre as causas mais frequentes da síndrome de Leigh, a seguir aos dos complexos IV e I (Miyabayashi et al., 1985; Shoffner e Wallace, 1995). Foram ainda descritos casos pontuais de défice dos complexos II e III, de CoQ e da biotinidase e de depleção do mtDNA, entre outros (Baumgartner et al., 1989; Absalon et al., 2001; Filiano et al., 2002; Van Maldergem et al., 2002; Pagnamenta et al., 2006)

Associação MEGDEL (OMIM sem referência) – De acordo com o acrónimo definidor, associa: *MEthylGlutaconic aciduria with sensori-neural Deafness, Encephalopathy Leigh-like* (Wortmann et al., 2006).

Síndrome MELAS (OMIM #540000) - Das iniciais dos sintomas definidores: *Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*. É definida pela tríade: episódios tipo acidente vascular cerebral antes dos 40 anos de idade, encefalopatia caracterizada por convulsões e/ou demência e acidose láctica (ou

hiperlactacidemia) e/ou *RRF*. Reforça o diagnóstico a presença de pelo menos dois destes sinais: desenvolvimento psicomotor normal prévio, cefaleias ou vômitos recorrentes (Hirano et al., 1992). Outras alterações incluem atraso psicomotor ou mental, ataxia, surdez, diabetes *mellitus* e fraqueza muscular, entre outros. Os elementos distintivos dos episódios tipo acidente vascular cerebral são lesões de hipodensidade nas imagens de ressonância magnética cerebral (RMN), mais frequentes nas regiões occipitais e temporais do que nas frontais, que não respeitam um território vascular e elevação do lactato, que pode ser limitada ao SNC (Matthews et al., 1991). Têm sido descritas alterações dermatológicas nalguns casos (Carmi et al., 2001). Embora se trate de uma doença do mtDNA, os primeiros casos foram descritos em crianças em 1984 (Pavlakakis et al., 1984). A mutação A3243G, do tRNA é encontrada em cerca de 80% dos doentes com MELAS. Por outro lado, metade dos doentes com esta mutação apresenta uma clínica diferente de MELAS (Hammans et al., 1991; de Vries et al., 1994).

Síndrome MERRF (OMIM #545000) - De: *Myoclonus Epilepsy Ragged-Red Fibres*. Associa epilepsia mioclônica progressiva e ataxia à presença de *RRF*. Outras manifestações frequentes são: neuropatia periférica, lipomas, baixa estatura, surdez e atrofia óptica. A idade de início tem variado entre os 5 e os 75 anos, sendo mais frequente nos adultos. Pode ser causada tanto por mutações do mtDNA (cerca de 80% dos casos devem-se a uma mutação do tRNA A8344G) como do nDNA (gene *POLG1*) (Shoffner et al., 1990; Van Goethem et al., 2003).

Síndrome MIDD (OMIM #520000) - De: *Mitochondrial Inherited Diabetes and Deafness*. Está associado à mutação A3243G, do mtDNA (Maechler e Andrade, 2006).

Síndrome MIRA (OMIM – sem referência) - De: *Mitochondrial Recessive Ataxia Syndrome*. É, a par da SCAE e da SANDO (ver adiante), uma síndrome de ataxia-neuropatia com início nas 2ª e 3ª décadas de vida, associada a mutações do gene *POLG1* (Hakonen et al., 2005; Copeland, 2008).

Síndrome MLASA (OMIM #600462) – De: *mitochondrial Myopathy, Lactic Acidosis, Sideroblastic Anemia*. Embora conhecida há muito, foi pela primeira vez descrita como síndrome em 1995 (Rawles e Weller 1974; Inbal et al., 1995). Pode associar ainda dismorfismo facial, microcefalia e atraso do neurodesenvolvimento. Mais recentemente, foram documentadas mutações no gene da pseudouridina sintetase-1 (*PUS1*), com repercussão funcional no tRNA mitocondrial e citosólico em alguns doentes (Patton et al., 2005).

Síndrome de Mohr-Tranebjaerg (OMIM #304700) - Síndrome de surdez-distonia ligada ao cromossoma X, caracteriza-se por surdez neurosensorial, distonia, disfagia, cegueira cortical, fracturas e paranóia ou défice mental. É causada por mutações de um gene envolvido na importação mitocondrial, *DDP1* (*Deafness Distonia Peptide*) (Tranebjaerg et al., 1995; Ezquerra et al., 2005).

Síndrome MNGIE (OMIM #603041) - De: *Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalopathy*. Também designada por POLIP (*Polyneuropathy, Ophthalmoplegia, Leucoencephalopathy, Intestinal Pseudo-obstruction*) é uma doença multissistémica, autossómica recessiva que se inicia antes dos 20 anos de idade e leva à morte pelos 40 anos. Os transtornos da motilidade gastrointestinal levam a pseudo-obstrução intestinal progressiva, diarreia crónica e malnutrição (Hirano et al., 1994). Cursa habitualmente com hipocitrulinémia. As alterações moleculares subjacentes são habitualmente múltiplas deleções ou depleção do mtDNA, associadas a mutações no gene da timidina fosforilase (*TP*) (Nishino et al., 1999). A redução da actividade daquela enzima leva a acumulação tissular e plasmática da timidina e da desoxiguanosina (Valentino et al., 2007).

Síndrome MSL (OMIM 151800) - De: *Multiple Symmetric Lipomatosis*. Trata-se de uma doença típica do adulto do sexo masculino, frequentemente associada a alcoolismo, que se manifesta por lipomas múltiplos não capsulados geralmente na região cervical ou ombros, associados em 30% dos casos a alterações neurológicas (ataxia cerebelosa ou sinais piramidais) (Hirose et al., 2006; Finsterer 2006). Tem sido ocasionalmente descrita em crianças e associada a disfunção mitocondrial e/ou alterações do mtDNA (Klopstock et al., 1997; Casali et al., 1999; Muñoz-Málaga et al., 2000; Castro-Gago et al., 2003).

Síndrome NARP (OMIM #551500) - De: *Neuropathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa*. Associa neuropatia periférica, ataxia cerebelosa e retinopatia pigmentar a convulsões e demência, podendo incluir enxaqueca e atraso mental (Holt et al., 1990). A idade de início varia entre um e 32 anos. É de transmissão materna, sendo que a mutação mais frequente é a T9893G do mtDNA, que afecta a ATPase 6 (complexo V). A hipocitrulinémia persistente que se verifica nesta síndrome e em outras DCRM poderá ser considerada um marcador de envolvimento intestinal, com défice da síntese intestinal de citrulina por falta de ATP (Parfait et al., 1999; Naini et al., 2005; Crenn et al., 2008).

Oftalmoplegia externa crónica progressiva (OMIM #157640; #609286 ...) - A CPEO (*Chronic Progressive External Ophthalmoplegia*) é uma das mais frequentes manifestações das miopatias mitocondriais (Carelli et al., 2006). Apresenta-se como ptose lentamente progressiva e limitação multidireccional da mobilidade ocular,

sobretudo para cima. Por vezes associa-se a fraqueza muscular e/ou alterações neurológicas como demência, episódios tipo acidente vascular cerebral, ataxia ou convulsões. Pode ainda integrar a KSS (Rowland, 1994). A alteração molecular subjacente pode ser uma grande deleção do mtDNA (formas esporádicas) ou deleções múltiplas do mtDNA (identificáveis em tecidos pós-mitóticos como o músculo), de transmissão mendeliana (Moraes et al., 1989). A maior parte das formas autossómicas dominantes (adPEO) têm mutações em um dos três genes *ANT1*, *Twinkle* ou *POLG1*. Algumas formas recessivas (arPEO) estariam associadas a mutações *POLG1*; outras, a mutações pontuais do mtDNA, sendo por isso de transmissão materna (Spinazzola e Zeviani, 2005).

Síndrome de Pearson - PS-(OMIM #557000) - É uma síndrome que ocorre tipicamente na criança, sendo também designado por *Pearson marrow-pancreas syndrome*. Caracteriza-se por anemia sideroblástica refractária com neutropenia e trombocitopenia variáveis, vacuolização dos precursores da medula óssea, insuficiência pancreática exócrina e hiperlactacidémia. Inicia-se nos primeiros meses de vida por anemia ou diarreia e é fatal antes dos 3 anos em mais de metade dos casos (Pearson et al., 1979). Os sobreviventes recuperam espontaneamente, mas geralmente desenvolvem KSS (Lee et al., 2007). Está associado a grandes deleções ou duplicações heteroplásmicas do mtDNA (Cormier et al., 1990; McShane et al., 1991).

Síndrome SANDO (OMIM #607459) De: *Sensory Ataxic Neuropathy, Dysarthria, Ophthalmoplegia*. Nestes doentes têm sido detectadas mutações do gene *POLG1* (Mano et al., 2003; Spinazzola e Zeviani 2005; Longley et al., 2005; Gago et al., 2006).

Síndrome SCAE (OMIM *174763) - De: *juvenile Spino-Cerebellar Ataxia, Epilepsy syndrome*. Associa-se a mutações do gene *POLG1* (Spinazzola e Zeviani 2005).

Síndrome de Sengers (OMIM #212350) – Caracteriza-se por cataratas congénitas, miocardiopatia hipertrófica, miopatia e acidose láctica (Sengers et al., 1975; van Ekeren et al., 1993). Em alguns doentes foi provado défice da CRM em músculo e défice de *ANT1* (Jordens et al., 2002; Morava et al., 2004).

2.3.2 Diagnóstico e classificação.

A clínica das DCRM é extraordinariamente pleomórfica. Alguns doentes têm quadros clínicos muito sugestivos de DCRM, enquadráveis em síndromes, mas a maior parte apresenta sintomas inespecíficos, comuns a muitos outros diagnósticos. Por outro lado, existe uma significativa sobreposição clínica entre muitas das síndromes mitocondriais descritas (Munnich et al., 2001).

O músculo tem sido o tecido de eleição para avaliação das alterações funcionais e histológicas associadas às DCRM, não só porque muitos dos doentes apresentam encefalomiopatia ou miopatia, como pelo facto de os miócitos, tal como os neurónios, terem um potencial de replicação celular muito baixo e portanto maior probabilidade de acumular sinais funcionais e morfológicos de lesão mitocondrial. Nas situações em que há envolvimento de outros órgãos ou sistemas, poderá ser vantajoso optar pelo estudo inicial do órgão em causa, quando acessível (Rustin et al., 1993). Mesmo em encefalopatias sem envolvimento hepático evidente, pode ser útil estudar o fígado, sobretudo se a investigação do músculo tiver sido normal ou inconclusiva (Panetta et al., 2005).

Conhecem-se mutações patogénicas em mais de 30 genes do mtDNA e em mais de 30 genes do nDNA (Thorburn, 2004). As alterações do mtDNA são responsáveis pela maior parte dos casos de DCRM na idade adulta e de até 25% dos casos na criança. A pesquisa directa das mutações mais frequentes do mtDNA a partir de sangue, sedimento urinário ou músculo está indicada no caso de algumas síndromes clássicas. Em alguns centros é realizada a sequenciação completa do mtDNA nos casos suspeitos (Wong e Boles, 2005). No entanto, em muitos doentes e particularmente na idade pediátrica o diagnóstico continua a basear-se na demonstração de um défice funcional da CRM (Thorburn et al., 2004b).

Estudo funcional da cadeia respiratória

A avaliação funcional do sistema da fosforilação oxidativa é difícil (Grazina et al., 2001)., visto a mitocôndria ser um organelo com múltiplas e complexas funções, como já referido. Por outro lado, a demonstração, directa ou indirecta de um défice funcional da CRM não garante que este seja primário (Fosslien, 2001; Thorburn et al. 2004a; Schwab et al., 2006).

Sinais bioquímicos indirectos de patologia mitocondrial

A avaliação do **estado redox** dos tecidos consiste na determinação do lactato, piruvato e corpos cetónicos (β -hidroxibutirato e acetoacetato) nos fluidos orgânicos.

A incapacidade de reoxidação do NADH e do FADH₂ pela CRM leva à acumulação mitocondrial das respectivas formas reduzidas, com aumento da relação NADH/NAD⁺ e

FADH₂/FADH. Consequentemente, observa-se um aumento da razão β -hidroxibutirato/ acetoacetato e da razão lactato/ piruvato, formas indirectas de avaliar o potencial redox mitocondrial e citosólico, respectivamente (Bonfont et al., 1991). Há acumulação de substratos não oxidados, nomeadamente do piruvato e consequentemente da respectiva forma reduzida, o lactato, cuja formação é favorecida pela presença de um aumento razão NADH/NAD⁺. Verifica-se nestas situações exacerbação da normal elevação pós-prandial da lactacidémia, uma vez que há obstrução a jusante. Pode igualmente surgir cetonémia paradoxal (isto é, elevação no período pós-prandial), sobretudo quando há envolvimento hepático significativo, já que a acetil-CoA proveniente da glicose via piruvato não pode ser normalmente oxidada no ciclo de Krebs devido ao bloqueio da CRM. Quando a acumulação de lactato/ piruvato é significativa pode acompanhar-se de uma elevação da alanina, resultante da transaminação do piruvato (Morava et al., 2006a).

Pelo facto de as refeições tornarem o défice mais notório, pode ser útil a determinação repetida do lactato, piruvato e alanina no pré e no pos-prandial (ciclo redox) ou após sobrecarga oral de glicose (Ching-Shiang et al., 1992; Poggi-Travert et al., 1996; Touati et al., 1997). A lactacidémia após exercício muscular, para o que é necessário a colaboração do doente, pode contribuir também para o diagnóstico, nomeadamente quando há clínica de miopatia (Argov, 1998). A determinação do estado redox do líquido cefalorraquídeo é útil sobretudo quando há clínica neurológica com lactacidémia normal. Por outro lado, a ressonância magnética espectroscópica protónica (¹H RMS) pode detectar picos de lactato nas lesões encefálicas, nos núcleos da base do cérebro (mesmo que nestes não se detectem lesões em RMN) ou no líquido cefalorraquídeo (Rocha et al., 2008).

A hipoxémia de qualquer origem é a causa mais frequente de défice secundário da CRM e um diagnóstico diferencial importante na hiperlactacidémia (Duke, 1999).

As condições de colheita e processamento das amostras biológicas, nomeadamente do sangue, são muito importantes na interpretação dos resultados do estudo redox (Bonfont et al., 1991; Diogo et al., 1999).

A ausência da demonstração de acumulação de lactato não exclui formalmente a DCRM, já que têm sido descritas formas de DCRM com confirmação molecular e níveis normais de lactato (Finsterer et al., 2001, Scaglia et al., 2004; Bohm et al., 2006).

Nas DCRM, a determinação dos **ácidos orgânicos** nos fluidos biológicos pode mostrar alterações. Um défice funcional da CRM leva ao bloqueio secundário das vias metabólicas a montante, como o ciclo de Krebs e a oxidação do piruvato proveniente da glicólise, dos ácidos gordos e do esqueleto carbonato de muitos aminoácidos. Dele pode resultar a acumulação e excreção urinária anormal de ácidos orgânicos, nomeadamente intermediários da β -oxidação dos ácidos gordos e do ciclo de Krebs (Gibson et al., 1992; Hagenfeldt, 1998; Sim et al., 2002; Yano et al., 2003). Por outro lado, algumas acidúrias

orgânicas podem associar-se a alterações mitocondriais funcionais secundárias. Considerando que grande parte das aminoacidopatias e acidúrias orgânicas se devem a defeitos de enzimas da matriz mitocondrial, não é de estranhar esta estreita relação, não só de proximidade como de eventual partilha de mecanismos reguladores comuns. O estudo dos ácidos orgânicos nos fluidos biológicos, designadamente urina e *líquor*, pode assim contribuir para o diagnóstico diferencial destas patologias (Barschak et al., 2006).

Estudo da capacidade mitocondrial de produção de energia - O estudo da produção de energia pela mitocôndria recorre a métodos sensíveis, para os quais são necessários tecidos frescos como células inteiras - linfócitos, linfoblastos, fibroblastos, miócitos, mioblastos - ou músculo - homogeneizado ou mitocôndrias isoladas- (Rustin et al., 1994; Thorburn et al., 2004a; Janssen et al., 2006a).

A avaliação do declínio da concentração de oxigénio em tecidos frescos por **polarografia** é um exame muito sensível do funcionamento da CRM. Permite localizar um eventual défice na CRM, através da avaliação indirecta da oxidação de vários substratos, na presença e ausência de inibidores específicos. De entre os inibidores do fluxo de electrões através da CRM a nível dos vários complexos destacam-se pela sua utilidade neste contexto: rotenona- complexo I; malonato - complexo II; antimicina A - complexo III; cianeto e azida - complexo IV; oligomicina-B -complexo V (Rustin et al., 1994). Com a medição do consumo de oxigénio em condições basais e após adição de ADP e com o recurso a desacopladores é possível detectar situações de desacoplamento entre o fluxo de electrões através da CRM e a síntese de ATP. As condições técnicas específicas são difíceis de padronizar e os resultados devem ser interpretados em conjunto com os restantes dados da avaliação da função mitocondrial (Rustin et al., 1994; Malgat et al., 1999).

A **quantificação de ATP** é habitualmente realizada por bioluminescência usando a reacção da luciferina-luciferase (Lemasters e Hackenbrock, 1979; Short, 2004). A fosfocreatina pode igualmente ser doseada nos tecidos (Janssen et al., 2006a).

A ressonância magnética nuclear do músculo com espectroscopia do fósforo 31 (^{31}P RMS) pode ser utilizada no diagnóstico, antes de métodos mais invasivos como a biópsia. Tem a vantagem de permitir uma avaliação quantitativa dos índices de função mitocondrial *in vivo*, de um modo seriado. Em contrapartida, é uma técnica cara, com necessidade de protocolos muito bem estabelecidos e frequentemente reservada a investigação (Bendahan et al., 2006). O achado de uma diminuição da relação fosfocreatina/ fósforo inorgânico em repouso, com uma recuperação lenta após o exercício é considerado um indicador fidedigno de disfunção mitocondrial (Argov, 1998; Jeppesen et al., 2007).

O estudo da **oxidação de substratos marcados com ^{14}C** , como o piruvato, o succinato e o malato, entre outros, através da medição do $^{14}\text{CO}_2$ formado, é um método

de avaliação da actividade das enzimas oxidativas intervenientes e da produção global de energia mitocondrial. Um obstáculo na CRM leva à acumulação de NADH e FADH₂, com a consequente inibição daquelas actividades enzimáticas. O uso de inibidores específicos permite localizar o défice, tal como nos outros testes de avaliação global da CRM. Ao possibilitar a avaliação da actividade de outras enzimas mitocondriais, como a piruvato-desidrogenase e as enzimas da β -oxidação dos ácidos gordos, este estudo pode contribuir para o diagnóstico diferencial (Janssen et al., 2006a; Wolf e Smeitink, 2002). A utilização de substâncias radioactivas limita o seu uso mais generalizado no diagnóstico.

Actividade enzimática dos complexos da CRM - A determinação da actividade enzimática dos complexos da CRM por espectrofotometria é o processo mais usado para avaliação funcional da CRM. Embora os métodos sejam na maior parte dos casos sobreponíveis, não há uniformidade na apresentação dos resultados, nem na interpretação dos mesmos. Estes são expressos de vários modos: em quantidade de substrato/minuto/mg de proteína ou grama de tecido, actividade *corrigida* para a citrato sintase, para o complexo IV ou para o complexo II, isto é, expressa como *ratio* entre a actividade do complexo em causa e a da enzima *marcadora* (Chrétien et al., 1994; Bernier et al., 2002; van den Heuvel et al., 2004; Barclay et al., 2005; Enns et al., 2005). Do mesmo modo, os valores são referidos ao limite inferior do normal ou a uma percentagem da média do valor de referência (v.r.) (Rustin et al., 1994; Thorburn et al., 2004b; Janssen et al., 2006a). Finalmente, alguns investigadores valorizam como diagnósticas alterações da relação das actividades dos complexos da CRM entre si, traduzindo um desequilíbrio funcional da CRM (Geromel et al., 1997).

Outros estudos - O doseamento de componentes com influência no funcionamento da CRM, como a CoQ, o citocromo c e a cardiolipina, entre outros, pode ser útil no diagnóstico das DCRM (Boitier et al., 1998; Appaix, 2000; Barth et al., 2004; Montero et al., 2005; Quinzii et al., 2008).

A **quantificação da CoQ**, habitualmente realizada no músculo e/ou fibroblastos por HPLC (cromatografia líquida de alta precisão), é o modo mais directo de detectar o défice da sua síntese, uma das poucas DCRM verdadeiramente tratáveis. Conhecem-se igualmente casos de défices secundários de CoQ no músculo que melhoram com a suplementação (Quinzii et al., 2006).

Potenciais défices de **citocromo c** poderiam ser rapidamente detectados pelo estudo polarográfico (Rustin et al., 1994). Alternativamente, pode quantificar-se por espectrofotometria os componentes da CRM contendo citocromo c em mitocôndrias isoladas (Appaix, 2000).

Em casos de suspeita de síndrome de Barth é possível o rastreio dos doentes candidatos ao estudo do gene TAZ (da tafazina) pela determinação das diversas fracções

da **cardiolipina** em sangue em cartão, plaquetas, linfócitos, fibroblastos ou tecidos (Barth et al., 2004; Kulik et al., 2008; Houtkooper et al., 2009).

É também possível a **avaliação dos componentes proteicos das enzimas** da CRM através de técnicas electroforéticas ou do uso de anticorpos específicos (Calvaruso et al., 2008; Willis et al., 2009).

A **inviabilidade de fibroblastos ou de linfócitos num meio de cultura com galactose** (em vez de glicose) poderá constituir um teste de rastreio de DCRM e /ou de défice de piruvato-desidrogenase. Quando há disfunção do metabolismo oxidativo, a utilização da galactose em vez da glicose não é suficiente para fazer face às necessidades energéticas das células. As células com défice energético não sobrevivem naquelas condições de cultura (Robinson et al., 1992; Bernier et al. 2002).

A **tecnologia de cíbridos** permite determinar a origem mitocondrial ou nuclear de um defeito da CRM. As células do doente, despojadas de núcleo (citoplastos), com mitocôndrias contendo mtDNA eventualmente mutado, são fundidas com células p^0 , com mitocôndrias desprovidas de mtDNA na sequência de tratamento com brometo de etídio. Se após a fusão, os cíbridos (*citoplasma híbridos*) resultantes manifestarem o défice da CRM, aquele tem origem provável no mtDNA do doente. No caso contrário a causa residirá no nDNA (King e Attardi, 1989; Tiranti et al., 1995).

Contributo da anatomo-patologia - O músculo, como tecido pós-mitótico, acumula evidência do sofrimento mitocondrial, traduzido por modificações estruturais e proliferação das mitocôndrias. Tem sido considerado a pedra basilar da investigação mitocondrial, já que pode mostrar lesões mesmo quando não afectado clinicamente (Vogel, 2001). Aquelas alterações podem ser encontradas noutros tecidos, como o fígado, o miocárdio, o rim e o intestino, entre outros (incluindo o encéfalo). Os tecidos afectados devem ser investigados sempre que possível (Chow e Thorburn, 2000). No entanto o contributo da histologia no diagnóstico das DCRM não é específico, já que é frequente encontrarem-se alterações morfológicas das mitocôndrias em muitas outras patologias, nomeadamente outras miopatias (Chou, 1968; Jongpiputvanich et al., 2005).

As anomalias morfológicas identificadas no músculo podem ser decisivas, não só para o diagnóstico de DCRM, como para o diagnóstico diferencial. Os estudos funcionais em homogeneizados de músculo podem não detectar alterações quando a percentagem de fibras lesadas é baixa (menos de 10%) ou quando a proliferação mitocondrial compensadora é intensa. Neste caso, pode até mesmo haver aumento da actividade global de um ou mais complexos da CRM. A histopatologia é muito importante neste contexto, já que pode detectar alterações não homogéneas sem tradução quantitativa, mas apenas qualitativa, o que acontece sobretudo nas doenças heteroplásmicas do mtDNA (Romero et al., 1999).

O contributo da anatomo-patologia no diagnóstico das DCRM resume-se à demonstração da acumulação de mitocôndrias anormais e/ou do défice de um ou mais complexos da CRM.

As *RRF*, caracterizadas pela acumulação subsarcolémica de mitocôndrias anormais, são assim designadas pelo seu aspecto com a coloração com o tricrómio de Gomori, em que densas colecções de mitocôndrias aparecem coradas de vermelho brilhante. São características das mutações pontuais tRNA ou dos rearranjos (delecções e duplicações) do mtDNA, embora possam surgir nas mutações dos genes do mtDNA que codificam proteínas ou nos do nDNA. O número de *RRF* varia entre 3-10% das fibras e, no mesmo doente, a sua densidade pode variar com a região muscular em causa (Romero et al., 1999). Podem ocorrer igualmente em outras doenças musculares primárias ou secundárias e em indivíduos idosos, a partir dos 40 anos (Dalakas et al., 1990; Rifai et al., 1995; Pesce et al., 2001). A sua presença na criança é muito rara e sempre anormal (Chow e Thorburn, 2000; Wolf e Smeitink, 2002; Miles et al., 2006). Com a coloração para a succinato-desidrogenase (SDH), um método histoenzimológico que evidencia a actividade daquele componente do complexo II da CRM, a acumulação de mitocôndrias traduz-se por uma coloração azul intensa: fibras azuis rotas (*blue ragged fibres*). As *RRF* ou as fibras azuis rotas, sempre valorizadas na criança como sinal de DCRM, são-no no adulto apenas se presentes em mais de 2% das fibras, uma vez que podem surgir com o avanço da idade (Walker et al., 1996).

Na criança as alterações morfológicas das mitocôndrias traduzem-se mais frequentemente pela presença de pequenos agregados subsarcolémicos, em forma de crescente (Miles et al., 2006). A sua presença em mais de 2% das fibras antes dos 16 anos de idade tem sido considerada critério de DCRM (Bernier et al., 2002).

Os défices dos complexos da CRM podem demonstrar-se por métodos histoenzimológicos (actividade enzimática específica) ou imunocitoquímicos (uso de anticorpos específicos). A alteração mais frequente é a presença de fibras COX negativas, sempre valorizadas na criança e nos adultos, acima dos 2% ou 5%, antes ou após os 50 anos, respectivamente. A distribuição das fibras COX negativas pode apresentar um padrão heterogéneo, relacionado com mutações do mtDNA, ou um padrão homogéneo, indicativo de alterações do nDNA. Na criança, a presença de fibras COX negativas é ainda mais rara do que a de *RRF* e, ao contrário do adulto, tem tendência a ser generalizada (Miles et al., 2006). Nos raros casos de défice do complexo II podem observar-se fibras SDH negativas (Rustin e Rötig, 2002; Dawson et al., 2003)

Os diversos componentes proteicos dos complexos da CRM podem ser identificados nos tecidos, independentemente da actividade enzimática, por anticorpos específicos que reagem com um anticorpo secundário ligado a um fluorocromo ou à peroxidase (Hanson et al., 2002).

As fibras musculares tipo I, identificadas pela coloração castanha clara com a ATPase a pH 9,4, distinta do tom mais escuro das fibras tipo II, são fibras de contracção lenta, ricas em mitocôndrias e lípidos, pobres em glicogénio e dependentes do metabolismo oxidativo. Apresentam uma marcada actividade das enzimas oxidativas mitocondriais, como a NADH-TR (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido- Tetrazolium Reductase), a SDH, a COX e a ATPase a pH baixo. Nos músculos com DCRM há frequentemente um aumento da normal variação do diâmetro das fibras e da percentagem de fibras tipo I, o que pode dever-se a um mecanismo de compensação. No entanto, a valorização diagnóstica destes achados é controversa (Romero et al., 1999; Enns et al., 2005; Miles et al., 2006).

Nas DCRM podem ainda verificar-se alterações inespecíficas, como acumulação moderada de glicogénio e de lípidos e atrofia muscular neurogénica, entre outras (Sarnat e Marín-Garcia, 2005).

A demonstração em microscopia electrónica de mitocôndrias morfológicamente anormais é importante no diagnóstico das DCRM. No entanto a interpretação das imagens não é fácil. A microscopia electrónica pode mostrar agregados subsarcolémicos ou intermiofibrilares de mitocôndrias, alongamento das cristas com orientação irregular, padrão em favo de mel, rodas concêntricas ou pobreza de cristas, com aspecto vacuolizado. A detecção de inclusões mitocondriais anormais do tipo cristalino ou globular, ou ainda a acumulação de gotículas lipídicas é igualmente possível (Bernier et al., 2002; Mierau et al., 2004).

A frequência com que nas DCRM são detectadas alterações mitocondriais em microscopia electrónica é variável. Esta variação pode estar relacionada com as condições técnicas e os critérios utilizados, já que são necessárias colheitas e processamentos muito rigorosos e as mitocôndrias apresentam normalmente um alto grau de pleomorfismo (Kyriacou et al., 1999). A indicação da microscopia electrónica na suspeita de DCRM é objecto de controvérsia (Mierau et al., 2004).

O estudo anatomo-patológico do encéfalo, habitualmente realizado no contexto de autópsia, tem importância diagnóstica, designadamente nas síndromes de Leigh e de Alpers.

Estudos de genética molecular - Conhecem-se mais de 190 mutações patogénicas do mtDNA (DiMauro et al., 2006; MITOMAP, 2008). O estudo do mtDNA mostra alterações patogénicas numa boa parte dos casos de DCRM no adulto e até 25% dos casos na criança (Rotig et al., 2004; Thorburn et al., 2004b).

A maioria das alterações do mtDNA apresenta-se em heteroplasmia e comporta-se como recessiva, isto é, o fenótipo surge para elevados graus de heteroplasmia, que, de resto, é variável com os tecidos (Boulet et al., 1992; Sciacco et al., 1994). Assim, a detecção de uma mutação no mtDNA não significa necessariamente uma relação causal

com a clínica. Há que quantificá-la e frequentemente pesquisá-la em vários tecidos para a poder valorizar.

As mutações do mtDNA são classificadas em rearranjos de grande escala (delecções parciais ou duplicações) e em mutações pontuais. Os primeiros afectam vários genes, são invariavelmente heteroplásmicos e são usualmente esporádicos. As mutações pontuais podem ser heteroplásmicas (mais frequentemente) ou homoplásmicas (ex: LHON) e são de transmissão materna, embora ocorram frequentemente de novo, sobretudo na criança (Thorburn, 2004).

Os métodos laboratoriais mais frequentemente usados para pesquisar mutações pontuais conhecidas são a *Polimerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) e a PCR- alelo-específica (PCR-AS) (Wong e Boles 2005). Na primeira, faz-se a pesquisa de uma mutação de cada vez, com amplificação por PCR do fragmento de mtDNA que contém o local da mutação, seguida da digestão dos produtos de PCR com uma enzima de restrição que corta os fragmentos mutados e os normais de um modo diferente. Assim, os fragmentos resultantes da digestão são separados por electroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (*BN-PAGE*) e visualizados com brometo de etidium. A quantificação da heteroplasma faz-se por densitometria de bandas, que permite a detecção de 5-10% de heteroplasma. A PCR- AS, mais sensível (até 1% de heteroplasma), permite a detecção de múltiplas mutações pontuais ao mesmo tempo, através de *PCR multiplex* (com múltiplos *primers*) seguida de análise *dot blot* dos produtos de PCR com oligonucleótidos alelo-específicos marcados com ³²P (sondas). Actualmente, a detecção de mutações e a determinação simultânea do grau de heteroplasma podem ser feitas por um método muito sensível, a PCR em tempo real (Bai et al., 2004). A pesquisa de mutações pontuais desconhecidas pode fazer-se por vários métodos baseados na detecção da heteroplasma, como *SSCP* (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) e rastreio de mtDNA *heteroduplex* (híbrido) e/ou por sequenciação directa do mtDNA.

O rastreio de grandes rearranjos do mtDNA (superiores a 500kb), incluindo delecções e duplicações faz-se por análise de *southern blot*. Após extracção do DNA total, digestão com enzimas de restrição e separação dos fragmentos em gel de agarose, as bandas são transferidas para uma membrana (de nitrocelulose ou *nylon*), hibridizadas com uma sonda marcada para o mtDNA e detectadas por autorradiografia, sendo avaliado o seu tamanho. As delecções do mtDNA também podem ser detectadas por *PCR-RFLP* (Wong e Boles, 2005).

A avaliação semi-quantitativa do mtDNA pode ser feita por *southern blotting* comparando a quantidade de um dado gene mitocondrial com a de um gene nuclear (Moraes et al., 1991). A análise por PCR em tempo real permite a quantificação mais rápida e mais rigorosa do mtDNA (Chabi et al., 2003; Bai et al., 2004).

O estudo de genes do nDNA que codificam proteínas mitocondriais é feito por sequenciação directa (Péquignot et al., 2001 Mandel et al., 2001).

Critérios de diagnóstico - As doenças são construções humanas... Há doentes e não doenças... Se a classificação das DCRM por síndromes pode ser útil nos adultos, o mesmo não se verifica na criança. Embora frequentemente multissistémicas, as DCRM podem manter-se localizadas a um órgão ou sistema durante uma boa parte da sua evolução. Dever-se-á colocar a hipótese de DCRM nos casos de miopatia e/ou de encefalopatia de causa desconhecida ou perante uma associação inexplicada de sintomas envolvendo órgãos aparentemente não relacionados pela sua função ou origem embrionária (Munnich 1996).

A abordagem laboratorial destes doentes é difícil, visto a mitocôndria ser um organelo com múltiplas e complexas funções, a cadeia respiratória ser constituída por complexos multi-enzimáticos codificados por dois DNA diferentes e o seu funcionamento estar dependente de vários outros componentes, nomeadamente sistemas de transporte membranar. Por outro lado, modificações bioquímicas do ambiente mitocondrial podem interferir com aquele funcionamento, directa ou indirectamente. A hiperlactacidémia é um dado inespecífico, podendo ter muitas outras causas e não é detectada num número significativo de doentes. Mesmo a detecção de alterações do mtDNA não é em muitos casos suficiente, já que estas podem não se acompanhar de sintomas (o que acontece frequentemente em estudos familiares de LHON) ou ser secundárias (Shinde et al., 2006). Devido à inexistência de testes diagnósticos definitivos e universalmente aplicáveis, têm surgido várias tentativas de classificação dos doentes com suspeita de DCRM que têm em conta aspectos clínicos, bioquímicos, neurorradiológicos, anatomopatológicos e moleculares. Associam frequentemente critérios maiores e *minor* para estabelecer o grau de certeza diagnóstico, à semelhança dos critérios de Jones revistos para a febre reumática (*Special Writing Group*, 1992). Walker definiu em 1996 critérios gerais de DCRM (Walker et al., 1996). Em 1999 Nissenkorn publicou os *Wolfson criteria for mitochondrial disease* (Nissenkorn et al., 1999). Os critérios de Walker foram adaptados à criança por Bernier em 2002: *modified Walker criteria for mitochondrial disease* (Bernier et al., 2002). No mesmo ano, foram divulgados os *Nijmegen criteria for mitochondrial disease* (Wolf e Smeitink, 2002).

Em 2004, Naviaux chamou a atenção para a existência de *problema de codificação* relativamente às DCRM: a décima classificação internacional das doenças da Organização Mundial de Saúde tem 10 códigos de classificação de DCRM: *doenças mitocondriais gerais (E88.3X)*, *MELAS (E88.31)*, *MERRF (E88.32)*, *Síndrome de Leigh (G31.82)*, *Síndrome de Alpers (G31.81)*; *KSS (H49.81)*; *LHON (G42.22)*; *Miopatia mitocondrial (G93.7)*; *piruvato-desidrogenase, piruvato-carboxilase e fosfoenolpiruvato-carboxicinase (E74.4)* e *outras doenças mitocondriais (E88.39)* (OMS - CID10, 1994). Este facto afecta

o seu registo correcto, nomeadamente em termos epidemiológicos e sobretudo a vida dos doentes no que se refere aos apoios na doença (Naviaux, 2004).

A **classificação das DCRM** tem sido um desafio e um tema em constante evolução. A classificação genética resolveria o problema, mas a sua aplicação prática é limitada por duas circunstâncias. Por um lado, uma parte significativa dos doentes, sobretudo pediátricos, não tem diagnóstico molecular. Por outro, existe uma fraca correlação entre o genótipo e o fenótipo, sobretudo nas DCRM associadas a mutações do mtDNA. O nDNA representa 99% do DNA total e codifica cerca de 1400 proteínas mitocondriais, 14% das quais estão directamente envolvidas na fosforilação oxidativa (Schon, 2009). Desde a detecção das primeiras alterações do mtDNA (Holt et al., 1988; Lestienne e Ponsot 1988; Wallace et al., 1988) e do nDNA (Bourgeron et al., 1995) muitas outras mutações têm sido descritas. No MITOMAP estão sistematizadas, e em actualização constante, as mutações do mtDNA e nDNA conhecidas (Ruiz-Pesini et al., 2006; MITOMAP, 2008). Uma classificação genética possível das DCRM está resumida no capítulo Anexos (página 255).

2.3.3 Fisiopatologia e tratamento

Como anteriormente referido, nas DCRM a relação genótipo/ fenótipo é de um modo geral pobre (Riggs et al., 1984; Naviaux 2004), sobretudo nas devidas a mutações do mtDNA (Rubio-Gozalbo et al., 2000a). As deleções do mtDNA podem estar associadas a *CPEO*, *KSS*, *PS*, mas também a *MELAS*, diabetes isolada ou miocardiopatia. A mutação A3243G, a causa mais frequente de *MELAS*, também foi encontrada em doentes com *CPEO*, *KSS* e diabetes isolada, entre outros (Schapira, 2006).

A expressão fenotípica das mutações do mtDNA/ nDNA depende de muitos outros factores para além da mutação causal, como a função e necessidade energética de cada célula/ tecido, a existência de isoenzimas específicas de órgão ou fase de desenvolvimento e o efeito cumulativo de toxinas ou outros factores ambientais. No que se refere às mutações do mtDNA são ainda importantes, o grau de heteroplasmia, a distribuição tissular e o efeito limiar, a acção de genes nucleares modificadores e a presença de determinados haplótipos (polimorfismos) (Kunz, 2003; Limongelli et al., 2004).

A fisiopatologia das DCRM é largamente desconhecida e provavelmente não uniforme. O défice energético, a lesão pelas *ROS* e o aumento da apoptose são consequência directa da alteração funcional da CRM (Brenner et al., 1998). O stress oxidativo tem sido implicado em casos concretos de DCRM (Neves et al., 2008). Num modelo animal de LHON e em híbridos foi demonstrado o papel patogénico das *ROS* inactivando o transportador de glutamato, com elevação dos níveis daquele aminoácido (Qi et al.,

2003; Beretta et al., 2004). O papel do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi igualmente demonstrado em cultura de fibroblastos de doentes com a mutação NARP e défice do complexo V (Geromel et al., 2001).

A alteração do metabolismo intracelular de cálcio e do papel sinalizador intracelular da mitocôndria será também de considerar na patogénese das DCRM, nomeadamente na diabetes mitocondrial. Em particular, a mutação A3243G do mtDNA poderia impedir a exocitose da insulina em resposta à elevação da glicémia (Brookes et al., 2004; Maechler e Andrade, 2006). Por outro lado, as proteínas respiratórias alteradas poderiam funcionar como auto-antígenos e desencadear mecanismos auto-imunes de lesão tissular (Campos et al., 1997).

Na síndrome MELAS foram demonstrados proliferação mitocondrial excessiva nos vasos musculares e cerebrais, *RRF* COX positivas no músculo e diminuição da citrulina e arginina (nos episódios tipo acidente vascular cerebral e também nos períodos intercíticos). Foi postulada a existência de um défice de óxido nítrico (e respectivo efeito vasodilatador) decorrente do seu sequestro a nível dos grupos heme da COX, o que parece comprovado pelo efeito benéfico da terapêutica com L-arginina (Schon e DiMauro 2003; Kubota et al., 2004; Koga et al., 2007).

Finalmente, as variações de sequência do mtDNA (polimorfismos) podem contribuir para diferenças funcionais individuais, conferindo susceptibilidade para certas doenças, não só primárias da CRM, mas também neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), psiquiátricas (doença bipolar) e neoplásicas (Munakata et al., 2004).

Tratamento geral - O tratamento das DCRM é apenas sintomático na grande maioria dos casos, sendo no entanto extremamente importante para a melhoria da qualidade de vida dos doentes (Chinnery et al., 2006a; DiMauro et al., 2006b). Implica uma vigilância clínica regular, de modo a detectar e tratar precocemente possíveis complicações, como diabetes, surdez, cataratas e envolvimento cardíaco, entre outros (Phoenix et al., 2006; Schaefer et al., 2006).

A fisioterapia e as terapias ocupacional, respiratória e da fala podem ser úteis em muitos casos. Realça-se a importância do exercício físico, mesmo e sobretudo nos doentes com miopatia, já que a inactividade promove a atrofia muscular e agrava os défices e (Taivassalo et al. 2006). Foi demonstrado que o exercício aeróbio é benéfico nos doentes com fenótipo predominantemente muscular. No entanto, a melhoria clínica da função mitocondrial demonstrada por medição *in vivo* (com ^{31}P RMS, entre outras) cursou com aumento da percentagem de mtDNA mutante, o que levanta questões em relação às suas consequências a longo prazo (Taivassalo et al., 2001)

Muitas DCRM cursam com convulsões, que de um modo geral respondem aos anticonvulsivantes (Kang et al., 2007). Quando não há alternativa terapêutica ao valproato de sódio, alguns autores defendem a administração concomitante de L-

carnitina, uma vez que o valproato inibe a captação da carnitina. Não deve no entanto aquele anticonvulsivante ser usado nos doentes com síndrome de Alpers ou sua suspeita, pelo risco de insuficiência hepática fatal (Bicknese et al., 1992; Gordon, 2006). Do mesmo modo, há que evitar o uso de outros fármacos que sejam potenciais toxinas mitocondriais (Bindoff, 1999).

Na DCRM a dieta deve ser equilibrada e normocalórica. O excesso de calorías aumenta a acumulação de substratos a montante dos défices enzimáticos, com agravamento da hiperlactacidémia e da produção de ROS, entre outras consequências (Faulks et al., 2006; Wallace, 2001). A proporção recomendada em hidratos de carbono e lípidos não é consensual (Bindoff, 1999; Sanz et al., 2006). A dieta cetogénica teria interesse, não só nos défices do complexo I, mas de um modo mais geral nas crianças com DCRM e epilepsia (Panneta et al., 2004; Kang et al., 2007).

Terapêutica farmacológica específica - O lactato, que se acumula numa proporção significativa de casos de DCRM é neurotóxico em altas concentrações. O dicloroacetato é um inibidor específico da piruvato-desidrogenase cinase, estimulando assim a actividade da piruvato desidrogenase. É deste modo a terapia mais eficaz na diminuição dos níveis de lactato (Stacpoole et al., 2008). No entanto, a sua utilização nas DCRM não é consensual devido à frequência de neuropatia periférica associada (Kaufmann et al., 2006; Stacpoole et al., 2008)

Na síndrome *MELAS* foi provada a eficácia terapêutica da administração de L-arginina, intravenosa na fase aguda (0,5g/Kg/d) e oral nos períodos intercríticos (0,15-0,3g/Kg/d) (Kubota et al., 2004; Schon e DiMauro 2003; Koga et al., 2007).

Nas décadas de 80 e 90 foram colocadas ênfase e expectativa no tratamento com transportadores de electrões, cofactores enzimáticos e varredores de ROS. Apesar de teoricamente interessantes, e à excepção de casos anedóticos, os resultados práticos são pouco encorajadores. Um desses casos, o de intolerância ao exercício numa adulta jovem (com uma mutação no gene do citocromo b), foi tentada a substituição funcional do complexo III por uma associação de vitaminas K e C (Eleff et al., 1984). A dramática melhoria inicial, documentada por ³¹P RMN, não se manteve nem ocorreu noutros casos semelhantes (DiMauro, 2006b). Marriage demonstrou que a suplementação de cofactores *in vitro* a linfócitos de doentes com DCRM aumenta significativamente a síntese de ATP (Marriage et al., 2004). A utilização do succinato como fonte alternativa de electrões nos défices do complexo I e na síndrome *MELAS* (A3243G) com aparente sucesso foi referido em apenas dois doentes (Shoffner et al., 1989; Oguro et al., 2004). Numa criança com défice do complexo IV por mutação no gene *SCO2* (que codifica uma proteína de *assembling* que introduz o cobre na holoenzima), o histidinato de cobre foi eficaz na regressão da miocardiopatia, mas não nas outras manifestações da doença (Freisinger et al., 2004).

O uso de varredores de radicais livres de oxigénio (vitaminas E e C, CoQ10, idebenona, glutatião e dihidrolipoato) ou de enzimas, como a superóxido-dismutase, baseia-se na constatação de que nas DCRM há um aumento do *stress* oxidativo (Panneta et al., 2004). Foi demonstrada uma diminuição dos níveis do glutatião, reforçando a lógica do seu uso no tratamento das DCRM (Hargreaves et al., 2005). O tratamento precoce com antioxidantes poderia melhorar o prognóstico dos doentes com *LHON* (Schapira, 2006). O uso frequente da CoQ e derivados no tratamento das DCRM resulta não só da sua eficácia referida em numerosos casos, mas também da sua aparente inocuidade. Se o efeito está definitivamente provado como terapêutica de substituição, a eficácia da CoQ como transportador de electrões e varredor de radicais livres nas DCRM não é consensual (Matthews et al., 1993; Lodi et al., 2001; Hausse et al., 2002; Mashima et al., 2000)

A justificação para a utilização terapêutica de algumas substâncias, como a CoQ10, a L-carnitina ou o ácido fólico, resulta da demonstração de deficiência primária ou secundária em alguns casos de DCRM. A identificação crescente de défices de CoQ, nomeadamente da sua síntese, veio relançar o uso da idebenona em doses elevadas: 30mg/Kg/dia até 600mg/dia (DiMauro e Rustin, 2009). A sua eficácia, embora globalmente boa, não se verifica em todos os casos (Aure et al., 2004; Salviati et al., 2005; Artuch et al., 2006). As DCRM podem cursar com défice secundário de carnitina por aumento da excreção urinária de acil-carnitinas acumuladas por inibição de outros processos oxidativos mitocondriais. A administração exógena de carnitina corrigiria o défice e evitaria o ciclo vicioso decorrente da falta de carnitina necessária à β -oxidação dos ácidos gordos. Em doentes com KSS e outras DCRM foi demonstrada uma diminuição dos níveis de folatos no *líquor* e a sua relação com leucodistrofia, que melhora após tratamento (Allen et al., 1983; Dougados et al., 1983; Pineda et al., 2006). Estaria assim indicado o uso precoce de ácido folínico (1-2,5mg/Kg/dia) nas DCRM com encefalopatia (Ramaekers et al., 2007).

A utilização terapêutica do monofosfato de creatina nas manifestações miopáticas das DCRM tem como fundamento teórico o seu papel como *armazém* de ligações fosfato de alta energia rapidamente mobilizáveis, mormente a nível muscular, bem como a constatação do aumento das massas musculares e eventualmente da força muscular decorrentes do seu uso em altas doses. A eficácia terapêutica da creatina nas formas miopáticas das DCRM é no entanto controversa (Tarnopolsky et al., 1997; Zange et al., 2002; Kornblum et al 2005).

Uma análise dos ensaios clínicos publicados sobre a eficácia das medidas terapêuticas actualmente disponíveis (vitaminas e suplementos alimentares, agentes farmacológicos e exercício físico) concluiu que não há clara ou estudos controlados que demonstrem a eficácia de qualquer intervenção terapêutica nas DCRM e que é necessária mais investigação nesta área (Chinnery et al., 2006 a).

Novas estratégias terapêuticas

- **Terapêutica farmacológica dirigida à mitocôndria** - Os doentes com DCRM poderão vir a beneficiar a médio ou longo prazo da chamada *intervenção farmacológica dirigida à mitocôndria*, que tem sido desenvolvida nos últimos anos. Os mecanismos que permitem direccionar os fármacos ou outras substâncias biologicamente activas como o DNA para as mitocôndrias fazem uso dos valores elevados do potencial da membrana interna da mitocôndria e da maquinaria de importação proteica mitocondrial, entre outros (Weissig, 2005).

- **Terapia Génica** - A crescente identificação dos genes responsáveis pelas DCRM, tanto do mtDNA como do nDNA, e o fracasso das abordagens terapêuticas clássicas têm levado à proposta de múltiplas formas de terapia génica, ainda em fase de investigação laboratorial, em cultura de células ou modelos animais (Larsson e Rustin 2001; Wallace 2001; Duarte e Videira, 2009).

Nas DCRM associadas ao nDNA, a substituição do gene em causa debate-se com os mesmos problemas levantados para as outras doenças mendelianas, como sejam o correcto encaminhamento dos vectores, a especificidade tissular, as respostas imunológicas e a adequada inserção do vector no genoma nuclear (Owen et al., 2000; Owen e Flotte, 2001; Schon e DiMauro 2003).

Nas doenças primárias do mtDNA levantam-se problemas específicos devido à poliplasmia e heteroplasmia e à distribuição heterogénea do mtDNA mutante nas células e tecidos. A dificuldade maior está no desenvolvimento de sistemas específicos de inserção de DNA ou outros agentes efectivos nas mitocôndrias em todo o corpo de um organismo vivo (D'Souza e Weissig 2004; Smith et al., 2004). Têm sido investigadas múltiplas estratégias idealizadas para corrigir os defeitos do mtDNA, entre as quais se destacam: a) A conversão dos genes mutados do mtDNA em genes normais do nDNA, ie a síntese citoplasmática do produto de um gene mitocondrial normal previamente introduzido no núcleo. A subsequente fusão com uma sequência codificadora permitiria a entrada na mitocôndria (expressão alotópica).

b) A importação de genes de outras espécies, equivalentes dos genes mutados (expressão xenotópica).

c) A manipulação da heteroplasmia do mtDNA, fazendo descer a percentagem de mtDNA mutado para níveis inferiores ao *limiar* de expressão clínica, através da remoção do mtDNA mutante ou da inibição da sua replicação. A remoção seria conseguida com moléculas antígenómicas dirigidas ao mtDNA na mitocôndria: catiões lipofílicos ou moléculas com uma pré-sequência peptídica (ex: ácidos nucleicos peptídicos -PNAs). Endonucleases de restrição específicas para o mtDNA mutante inibiriam a sua replicação. Os doentes com miopatia mitocondrial poderiam beneficiar de estratégias de manipulação da heteroplasmia pela proliferação das células satélite (ricas em mtDNA nativo) induzida por lesão local (com miotoxinas, por exemplo) ou pelo exercício

excêntrico (contrações de alongamento). A redução do mtDNA mutado dever-se-ia a uma fusão das células satélite com as fibras musculares maduras. Desconhecem-se as suas consequências a longo prazo, já que pode haver exaustão das células satélite ou aumento do mtDNA mutado com o tempo. O desvio da heteroplasmia pela selecção positiva das células com mtDNA nativo foi conseguido com a substituição da glicose por corpos cetónicos como fonte de energia numa cultura de híbridos contendo mtDNA de um doente com KSS (Santra et al., 2004). Esta selecção natural das células mais ricas em mtDNA nativo em meio adverso abriria perspectivas para o eventual uso mais generalizado de dieta cetogénica no tratamento de doentes com DCRM (DiMauro, 2006).

- Intervenção no metabolismo dos nucleótidos mitocondriais - Têm sido identificadas várias DCRM em que alterações do metabolismo dos nucleótidos na mitocôndria estão no centro da fisiopatologia. Mutações nos genes *POLG1*, *ANT1*, *Twinkle*, *Timidina fosforilase*, *TK2* e *DGUOK* provocam alterações da manutenção do mtDNA e é possível que a manipulação dos níveis de nucleótidos livres na mitocôndria possa ser útil para o tratamento destes doentes. A vitamina B12 poderia ser vantajosa neste contexto (Chinnery e Bindoff, 2003). Nos doentes com MNGIE, a diminuição dos níveis de timidina e desoxiuridina através da hemodiálise revelou-se demasiado efémero, estando em investigação o uso de transplante de células histaminais alogénicas (DiMauro, 2006b). Nas síndromes de depleção do mtDNA provocados por défice da *DGUOK*, a administração dos produtos em falta, monofosfato de desoxiguanosina (dGMP) e monofosfato de desoxiadenosina (dAMP) poderá vir a ser uma arma terapêutica, a julgar pelos resultados em fibroblastos dum doente (Taanman et al., 2003).

2.3.4 Prognóstico e aconselhamento genético

O **prognóstico** das DCRM é de um modo geral sombrio, com acentuada morbidade e morte prematura (Chinnery et al., 2006). A mortalidade varia entre 10-50% /ano após o diagnóstico, na criança e entre 5-20% /ano após o início clínico, no adulto (Naviaux, 2004). O facto de nas crianças predominarem as mutações do nDNA e de a síndrome de Leigh, incluindo a forma *MILS*, ser uma condição de início precoce, são factores que influenciam adversamente o prognóstico (Rubio-Gozalbo et al., 2000a). De facto, com excepção dos muito raros casos com boa evolução, como o défice benigno da COX (DiMauro et al., 1983; Zeviani et al., 1987; Lev et al., 2002; Debray et al., 2007c), o prognóstico é grave nas apresentações pediátricas, estando directamente relacionado com a precocidade da apresentação clínica (Garcia-Cazorla, 2005). Numa série de 101 crianças com défice da COX, 66% faleceram antes da idade adulta, metade das quais nos primeiros dois anos de vida (Bohm et al., 2006). Um dos factores que afecta desfavoravelmente a sobrevivência de crianças com DCRM é a existência de miocardiopatia

(Scaglia et al., 2004). Foi demonstrada maior gravidade de apresentação clínica nos doentes pediátricos do sexo masculino com mutações no gene *POLG1* (Horvath et al., 2006). Também outras DCRM, como a *LHON* têm estado associadas a maior gravidade no sexo masculino (Carelli et al., 2003; Hudson et al., 2005), o que seria indício da modulação do defeito primário por genes modificadores.

A terapêutica preventiva através do **aconselhamento genético** e diagnóstico pré-natal é cada vez mais importante nas DCRM. São doenças congénitas, que podem apresentar todas as formas de hereditariedade. Uma parte significativa parece ser esporádica (Thorburn, 2004; Horvath et al., 2006).

Segundo Thorburn, em termos de aconselhamento genético das DCRM, há três tipos de situações a considerar (Thorburn e Dahl, 2001): DCRM por mutação do nDNA; DCRM com diagnóstico baseado em défice significativo de um ou mais complexos da CRM ou outros critérios majores, sem mutação patogénica identificada e DCRM por mutação do mtDNA

DCRM por mutação do nDNA - São conhecidos cada vez mais genes nucleares com mutações que afectam directamente a CRM (MITOMAP, 2008). São todos de transmissão autossómica, excepto a Síndrome de Barth que é ligada ao X. As DCRM por mutação do nDNA são predominantemente de apresentação pediátrica (Rubio-Gozalbo et al., 2000a). A identificação de uma mutação num gene nuclear permite um cálculo preciso do risco de recorrência e diagnóstico pré-natal fiável por análise directa da mutação em vilosidades coriônicas e mesmo diagnóstico genético pré-implantação.

DCRM com diagnóstico baseado em critérios majores, sem mutação identificada - Na maior parte das crianças com DCRM, o diagnóstico baseia-se na identificação de um défice enzimático com base genética desconhecida, pelo que o risco de recorrência é incerto. Em certas circunstâncias, é possível calcular aquele risco, tendo em conta o tipo de défice, a apresentação clínica e a história familiar (Thorburn e Dahl 2001). Alguns centros oferecem diagnóstico pré-natal baseado em doseamento enzimático nas famílias com um caso índice de DCRM sem mutação patogénica conhecida apenas nos casos em que o probando foi sintomático nos primeiros meses de vida (isto é, se é provável que o defeito seja autossómico recessivo), na ausência de evidência de que possa tratar-se de uma mutação do mtDNA, no caso do defeito enzimático ser expresso em fibroblastos em cultura e se houver disponíveis culturas de fibroblastos dos pais (Niers et al., 2003).

As DCRM, mesmo as causadas por mutações de genes nucleares (possibilidade da existência de isoenzimas) e sobretudo as que têm origem no mtDNA, apresentam especificidade tissular, pelo que é difícil prever, com base no estudo funcional da CRM nas vilosidades coriônicas, o tipo de tecidos afectados e sua gravidade futura numa criança. Se os fibroblastos (que têm uma origem embrionária comum aos coriócitos e

amniócitos) apresentam, a par do músculo, o mesmo tipo de défice, assume-se empiricamente que a especificidade tissular seria eliminada (Niers et al., 2003). Esta interpretação não é, no entanto, consensual (Thorburn, 2004). De qualquer modo, apenas 30 a 60% dos défices da CRM encontrados no músculo se expressam também em fibroblastos, o que reduz significativamente o número de famílias a quem é possível oferecer um diagnóstico pré-natal (Niers et al., 2003, van den Heuvel et al., 2004). As famílias devem ser sempre informadas da possibilidade de falsos negativos, ie, de que uma actividade enzimática normal nas vilosidades coriônicas não garante um bebé sem DCRM. A maior parte dos centros oferece diagnóstico pré-natal para os défices do complexo IV e apenas alguns o fazem para os do complexo I (Ruintenbeek et al., 1996; Thorburn e Dahl 2001; Niers et al., 2003).

DCRM por mutação do mtDNA - O diagnóstico pré-natal das doenças causadas por mutações do mtDNA, causa da maior parte dos casos de DCRM em doentes adultos e de até 20-25% nas crianças, é dificultado pelas suas características de transmissão e distribuição. Em regra, as grandes deleções do mtDNA não são hereditárias nem transmissíveis e ocorrem de novo (na ovogénese ou na fase inicial da embriogénese). Quando presentes num ovócito fertilizado, têm muito pouca probabilidade de passar pelo gargalo entre o ovo e o embrião (DiMauro, 2006b). Um estudo multicêntrico de 226 famílias demonstrou que as mães não afectadas têm muito pouca probabilidade de ter um segundo filho doente. No entanto, mas nas mães com deleção esse risco é de um em 24 (Chinnery et al., 2004). Nas mutações heteroplásmicas, a avaliação da transmissão da mutação é dificultada pelo efeito de gargalo genético que ocorre durante o desenvolvimento e que resulta numa grande variação do teor de mtDNA mutante transmitido aos diferentes descendentes (Brown et al., 2006). Já as mutações homoplásmicas, como a *LHON*, serão transmitidas a todos os descendentes. Mesmo nestes casos, o aparecimento de manifestações clínicas é difícil de prever devido à penetrância variável (Brown et al., 2006). No caso das mutações pontuais do tRNA, o diagnóstico pré-natal é na prática impossível. De facto, a percentagem de mutação dos amniócitos ou vilosidades coriônicas não é necessariamente representativa dos outros tecidos fetais e a carga mutacional medida em amostras pré-natais pode mudar in útero ou após o nascimento devido à segregação mitótica (Chou et al., 2004). Excepção, seriam as mutações da ATPase6 associadas com *NARP/MILS* (White et al., 1999).

Na prática, a prevenção da transmissão da maior parte das doenças associadas a mutações do mtDNA passa por os pais optarem por não terem filhos ou recorrer a um dos seguintes procedimentos: diagnóstico pré-natal em casos seleccionados; diagnóstico pré-implantação; transferência de citoplasma e dador de ovócito com fertilização *in vitro* ou transferência nuclear (Thorburn e Dahl 2001). Este procedimento, que consiste na transferência de um núcleo de um ovo fertilizado para um citoplasma de um dador saudável foi realizado com sucesso em ratos e foi aprovado em 2005 para

experimentação em humanos no Reino Unido (Brown et al., 2006). Embora levante questões éticas, seria a forma mais eficaz de prevenir a transmissão materna de um defeito do mtDNA (Chinnery e Bindoff, 2003).

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

3. OBJECTIVOS

Neste trabalho fiz uma reflexão sobre o diagnóstico das DCRM no HP, quando se completou uma década desde a implementação dos métodos de estudo funcional e genético da mitocôndria nos doentes em que se coloca a suspeita desta patologia.

Neste contexto, defini como principal objectivo deste estudo retirar, da experiência de uma década e da revisão bibliográfica sobre a prática de outros grupos, os ensinamentos necessários a uma melhor actuação clínica no futuro.

Para atingir este objectivo procurei sucessivamente:

1. Da revisão dos processos clínicos dos doentes investigados naquele período, e após a sua classificação de acordo com critérios de diagnóstico actuais, apurar os sinais e sintomas que legitimam uma investigação da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) na população servida pelo HP.

2. Dos estudos funcionais inespecíficos da CRM, inferir quais os que contribuem de um modo inequívoco para o diagnóstico.

3. Definir quais os diagnósticos diferenciais a considerar e, conseqüentemente, as investigações etiológicas a fazer, antes da realização de uma biópsia para estudos mitocondriais.

4. Avaliar os procedimentos diagnósticos específicos de DCRM que foram sendo usados ao longo deste período, nomeadamente no que se refere ao estudo da CRM, e correlacionar os seus resultados com a clínica e o diagnóstico final.

5. Aplicar à população em estudo os dois sistemas de critérios de diagnóstico das DCRM na criança mais usados internacionalmente, com o objectivo de definir uma bateria diagnóstica fidedigna, aplicável no contexto da realidade clínico-laboratorial do HP.

6. Identificar os estudos específicos da função da cadeia respiratória mitocondrial e dos mtDNA e nDNA) a realizar, de modo a tornar mais sensível, específica e rentável a investigação etiológica destes doentes.

7. Estabelecer um plano de acompanhamento dos doentes seguidos na Unidade de Doenças Metabólicas do HP, em colaboração com as outras especialidades médicas e cirúrgicas, de acordo com *guidelines* internacionais, de modo a proporcionar a estes doentes o melhor nível possível de cuidados assistenciais.

Tive como segundo objectivo fazer uma estimativa da incidência e prevalência das DCRM com início das manifestações clínicas na primeira década de vida na Região Centro de Portugal.

Finalmente, propus-me contribuir, através da divulgação da experiência da Unidade de Doenças Metabólicas do HP, para um melhor conhecimento das DCRM em pacientes

portugueses, de modo a incentivar o seu diagnóstico mais precoce, com vista ao aconselhamento genético e ao desenvolvimento de terapias mais eficazes

CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da amostra em estudo

A amostra objecto da presente avaliação é o grupo das crianças investigadas no HP por suspeita de DCRM entre 1997 e 2006 (10 anos). Foram considerados apenas os doentes cuja investigação incluiu o estudo de tecidos extra-sanguíneos: músculo, fígado e/ou miocárdio.

Fez-se a análise retrospectiva dos processos clínicos dos doentes acima referidos, no que se refere à raça, sexo, idade e clínica de apresentação, antecedentes pessoais, história familiar, área de residência, exames complementares de diagnóstico realizados, diagnóstico final e evolução clínica.

Avaliou-se os seguintes parâmetros clínicos: antecedentes gestacionais e perinatais, antecedentes familiares, idade de início dos sintomas, apresentação e evolução clínicas. Foram ainda analisados o rastreio de envolvimento multiorgânico e outra investigação etiológica, incluindo os estudos mitocondriais inespecíficos e específicos.

Dos antecedentes gestacionais e perinatais avaliou-se: o número de ordem da gestação, o seu tipo (normal, de risco por mortes pré-natais anteriores ou outras causas) ou complicada (ameaça de aborto e/ou parto prematuro, doença materna e/ou fetal, diminuição dos movimentos fetais) e sua duração; o ano de nascimento; o número de ordem e tipo de parto [eutócico/ distócico (fórceps/ ventosa/ cesariana)]; o registo de asfixia perinatal (definida como Índice de Apgar inferior ou igual a 3 ou 7 ao 1º e 5º minutos, respectivamente) e a necessidade de reanimação neonatal e tipo de reanimação (máscara e oxigénio, entubação endotraqueal com ventilação assistida); a antropometria ao nascimento; a história de internamento no período neonatal e sua duração.

Dos antecedentes familiares, assinalou-se: a etnia, o distrito da residência familiar, a existência e tipo de consanguinidade, a história de mortes inesperadas em familiares próximos e respectiva idade, a idade e estatura maternas, os antecedentes patológicos relevantes nos pais e irmãos e nos familiares das linhas materna e paterna.

O tipo de apresentação clínica foi subdividido em crónico ou agudo, neurológico e/ou muscular (designado por NM) ou extra neurológico e/ou muscular (designado por ENM) e, segundo o método de Nijmegen, em muscular, neurológico ou multissistémico (Wolf e Smeitink, 2002). As manifestações clínicas na apresentação e evolução foram analisadas por órgãos ou sistemas e verificada a existência de síndromes mitocondriais clássicas. A evolução clínica foi classificada em NM ou ENM e em multissistémica ou limitada a menos de três órgãos ou sistemas. Foram considerados o prognóstico funcional e vital [melhoria, estabilização do quadro clínico, agravamento ou evolução fatal (perfil temporal do óbito, antes ou após os seis meses de evolução da doença)] e as idades dos doentes no fim do período do estudo ou do óbito.

A antropometria ao nascimento foi aferida pelas tabelas de Fenton (Fenton, 2003). O crescimento estaturoponderal e do perímetro cefálico foi avaliado pelas tabelas publicadas por Jones (Jones, 1997).

A apreciação do desenvolvimento psicomotor foi realizada com recurso a várias escalas: a escala de competências do neurodesenvolvimento infantil (*Growing Skills II*), a escala de desenvolvimento de Ruth Griffiths e a escala de inteligência de Weschler para crianças - III (*WISC III*) (Griffiths, 1970; Griffiths, 1984; Martin e Sundara, 2003; Weschler, 2003). Na *Growing Skills II* foram considerados 14 níveis para 10 áreas do neurodesenvolvimento global, nomeadamente: postura passiva, postura activa, locomoção, manipulação, visual, audição e linguagem, expressão da linguagem, interacção social, autonomia e cognição. Calculou-se em cada caso um quociente de desenvolvimento (QD) aproximado, multiplicando por 100 o *ratio* entre a média das idades de desenvolvimento estimadas para as diferentes áreas e a idade cronológica. Na escala de desenvolvimento mental de Ruth Griffiths foram avaliadas as áreas motora, pessoal-social, audição-fala, coordenação olho-mão, realização e raciocínio prático. Os resultados foram expressos em termos de QD (Griffiths, 1984). Com a *WISC III*, foram calculados os Quocientes Intelectuais (QI) verbal, de realização e escala completa (Weschler, 2003). Utilizou-se uma escala de gravidade do atraso de desenvolvimento psicomotor adaptada da classificação da deficiência mental da Associação Americana de Psiquiatria (Organização Mundial de Saúde, 1994; *American Psychiatric Association*, 2002). Considerou-se haver atraso de desenvolvimento psicomotor ligeiro, moderado, grave ou profundo quando o QD ou o QI obtido na avaliação anterior à biópsia foi de 50-69, 35-49, 20-34 e inferior a 20, respectivamente. O atraso do neurodesenvolvimento foi classificado de global quando duas ou mais das áreas avaliadas estavam atingidas.

As crianças com epilepsia foram classificadas de acordo com a classificação das convulsões e síndromes epilépticas da *International League Against Epilepsy (ILAE)* (Liga Portuguesa contra a epilepsia, 1996).

Estabeleceu-se como ano do diagnóstico e idade de diagnóstico aqueles em que foi realizada a primeira biópsia para estudos mitocondriais. A demora no diagnóstico foi definida como o intervalo de tempo entre as primeiras manifestações (excluídas as pré-natais) e a execução da primeira colheita de tecidos para estudos mitocondriais. O tempo de evolução foi estabelecido como o intervalo de tempo entre os primeiros sintomas e a idade do óbito ou o fim do período de estudo.

Considerou-se haver evolução multissistémica quando três ou mais sistemas orgânicos (nervoso central, nervoso periférico, muscular esquelético, ocular, auditivo, cardíaco, hepático, renal, digestivo e cutâneo) foram atingidos, de um modo não secundário. Assim, as alterações ortopédicas e pulmonares consideradas decorrentes da doença neurológica e/ou muscular não foram consideradas neste contexto, o mesmo acontecendo com as insuficiências cardíaca e renal associadas a falência multiorgânica

terminal. As alterações oftalmológicas por lesão de pares cranianos (por exemplo: estrabismo, oftalmoplegia e ptose) foram consideradas como fazendo parte das manifestações NM.

Foram analisados os exames complementares de diagnóstico realizados a cada doente para investigação etiológica. Estes foram ditados pela clínica e evolução, não tendo havido um *protocolo* de investigação aplicado a todos.

O rastreio (clínico, bioquímico, electrofisiológico, imagiológico e/ou histológico) de envolvimento multiorgânico (fígado, rim, coração, músculo, sistema nervoso e periférico, pâncreas, intestino, endócrino, medula óssea, visão, audição e pele) foi feito na maior parte dos doentes.

As imagens do SNC obtidas por tomografia axial computadorizada (TAC) e/ou RMN foram caracterizadas quanto à presença ou não de atrofia (global, cortical, subcortical, cerebelosa, do tronco ou do corpo caloso), de lesões (traduzidas por hipersinal nas sequências de TR longo ou/e hipossinal em T1 em RMN e/ou hipodensidade em TAC) da substância branca supra ou infratentorial, núcleos da base (lenticular e caudado), tálamo, substância negra, núcleos vermelhos, núcleos subtalâmicos, substância cinzenta periaquedutal, pedúnculos, protuberância, bolbo raquidiano e núcleos cerebelosos.

4.2 Estudos mitocondriais

4.2.1 Estudos bioquímicos

A colheita de sangue para estudo redox ou lactato isolado foi realizada sem garrotagem e com o mínimo possível de luta, em veia periférica ou central. Um ponto redox no sangue associou a determinação da glicemia e dos ácidos gordos livres, ao lactato, piruvato, β -hidroxibutirato e acetoacetato. A amostra ($\leq 2,5$ ml) foi recolhida para tubo com EDTA e fluoreto de sódio. No *líquor*, foram determinados o lactato e o piruvato. A porção destinada aos doseamentos do piruvato e do acetoacetato, tanto no sangue como no *líquor*, foi imediatamente desproteïnizada com ácido perclórico a 8%, na proporção de um terço de fluido biológico para dois terços de ácido (medidos com micropipeta *Gilson*, à *cabeceira do doente*). O transporte imediato das amostras até ao laboratório foi feito em recipiente com gelo. As amostras foram analisadas no mesmo dia da colheita ou congeladas a -20°C até serem processadas, menos de 72 horas após a colheita, de acordo com as recomendações publicadas (Vassault et al., 1991).

As determinações do lactato, piruvato, β -hidroxibutirato e acetoacetato, glicose e ácidos gordos livres foram feitas por métodos espectrofotométricos (Czok e Lamprecht, 1974; Williamson et al., 1962; Shimizu et al., 1980; Noll, 1984).

Nos últimos anos do período do estudo foi possível a realização de ^1H RMS na maior parte dos doentes submetidos a estudo por RMN encefálica. Os estudos de ^1H RMS foram efectuados em equipamento de 1.5 tesla (Signa, GE) por técnica *PRESS* (*Point resolved spectroscopy*) com TE (*echo time*) de 144ms (milisegundos). Foi apreciada a existência de picos anormais de lactato em zonas lesionais e/ou nos gânglios da base do cérebro (Boddaert et al., 2008).

Considerou-se haver hiperlactacidémia para valores de lactato plasmático superiores a 2,1mM em qualquer idade e acidose láctica quando a lactacidémia superior a 7mM se associou a acidose metabólica sem outra causa conhecida. Subdividiu-se a amostra em termos de lactacidémia em cinco subgrupos: acidose láctica; hiperlactacidémia em três ou mais determinações; hiperlactacidémia em menos de três determinações; lactato normal em menos de três determinações; lactato normal em três ou mais determinações,

O lactato do *líquor* foi considerado elevado quando superior a 2,1mM em qualquer idade.

A relação lactato/piruvato foi tida como elevada se superior a 20, tanto no plasma como no líquido cefalorraquídeo.

A cetonémia foi analisada pelo *ratio* entre os níveis de corpos cetónicos (somatório do β -hidroxibutirato e acetoacetato) e de ácidos gordos livres determinados em simultâneo e pela razão β -hidroxibutirato/ acetoacetato. Valores normais: cetonémia total - 0,11

$\pm 0,09$ (0,02-0,20) μM ; β -hidroxibutirato/ acetoacetato - $2,9 \pm 2,2$ (0,7 -5,1) (Diogo et al., 1999).

O estudo dos aminoácidos nos fluidos biológicos foi realizado por cromatografia de troca iónica, de acordo com protocolos bem estabelecidos (Thomson e Miles, 1964). Definiu-se hiperalaninémia como níveis plasmáticos de alanina superiores a $410\mu\text{M}$, significativa se superiores a $450\mu\text{M}$. Níveis plasmáticos de prolina superiores a $410\mu\text{M}$ foram classificados como hiperprolinémia.

Os ácidos orgânicos urinários foram determinados por cromatografia capilar em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (Duez et al., 1996).

A colheita de sangue para estudo mitocondrial em linfócitos (5-10ml) foi realizada por punção venosa para tubos com EDTA e transporte imediato ao laboratório.

A recolha de biópsias de músculo esquelético foi realizada no bloco operatório com anestesia geral em sessão cirúrgica programada para o efeito ou, sempre que possível, em coordenação com outras cirurgias de que o doente necessitasse. Na indução anestésica e durante a intervenção foram usados (nas doses habituais): tiopental/ propofol, sevoflurano, fentanil/ alfentanil e rocurónio/ atracurio. O músculo deltóide esquerdo foi o de eleição, excepto nos casos em que a cirurgia simultânea expunha outros grupos musculares ou nas colheitas *post mortem*, em que se usou por vezes músculo da parede abdominal.

As biópsias hepáticas foram realizadas com agulha, guiadas por ecografia e com o doente anestesiado com sevoflurano e alfentanil.

Quando necessário, foram realizadas colheitas imediatamente após a morte (até à 3ª hora). Todos os espécimes de miocárdio foram colhidas nestas condições.

As amostras de músculo, fígado e miocárdio foram imediatamente congeladas em neve carbónica e transportadas ao Laboratório de Bioquímica Genética do CNC, sendo conservadas temporariamente em arca congeladora a -80°C , quando necessário. No primeiro período do estudo separou-se simultaneamente uma amostra fresca de músculo esquelético em meio próprio (meio de extracção de mitocôndrias) para transporte, isolamento de mitocôndrias e estudo polarográfico.

Nos primeiros anos do período do estudo foram feitas a avaliação polarográfica e a determinação da actividade enzimática dos complexos II, III e IV da CRM em linfócitos e dos complexos I a V em mitocôndrias isoladas de músculo.

Em todo o período do estudo esteve disponível a determinação da actividade enzimática dos complexos I a V da CRM em homogeneizado de tecidos (músculo esquelético, fígado e miocárdio). O isolamento de linfócitos e de mitocôndrias de músculo esquelético e a preparação de homogeneizados de tecidos foram realizados segundo os métodos descritos por Rustin (Rustin et al., 1994). A concentração de proteínas foi determinada

pelos métodos de Bradford ou de Lowry, consoante o teor proteico da amostra era inferior a 5 ou superior a 10µg/ml, respectivamente (Lowry et al., 1951; Bradford, 1976).

A análise do consumo de oxigénio foi feita por polarografia em linfócitos e em mitocôndrias isoladas, de acordo com o método usado por Rustin, com a utilização de um eléctrodo de oxigénio do tipo Clarke em duas câmaras. Estudou-se segmentos específicos da CRM: o segmento I-IV, o complexo II e o complexo III, através da oxidação do malato-piruvato, do succinato e do duroquinol, respectivamente, com o uso de activadores e inibidores específicos (Rustin et al., 1994).

As actividades enzimáticas dos complexos da CRM e da citrato sintase foram avaliadas de acordo com os protocolos publicados por Darley-Usmar e por Rustin num espectrofotómetro de duplo comprimento de onda (DW -2000™, Aminco) associado a um registador (Graphtec Pen Plotter MP 4400) e a um banho termostatizado (37°C), ligado ao compartimento onde se colocou a amostra (Rustin et al., 1994).

Nos linfócitos foram estudados os complexos II, III, IV e o segmento II+III da CRM e a citrato sintase por espectrofotometria. Nos homogeneizados de tecidos (músculo, fígado, miocárdio) e nas mitocôndrias isoladas, foram também investigados os complexos I e V da CRM, assim como o segmento I+III.

A aplicação dos métodos anteriormente referidos às amostras biológicas em causa foi descrita por Grazina (Grazina, 2004).

A actividade enzimática foi expressa de quatro modos diversos: nmol/min/mg proteína, em função do limite inferior do v.r.; nmol/min/mg proteína, em função da percentagem da média do v.r.; corrigida para a citrato sintase, em função do limite inferior do v.r.; corrigida para a citrato sintase, em função da percentagem da média do v.r.

Considerou-se ser a actividade enzimática da CRM inferior ao normal (num tecido ou no total dos tecidos estudados em cada doente), sempre que pelo menos um dos complexos enzimáticos (I a V) apresentasse valor inferior ao normal (inferior a 30% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase) em qualquer tecido. Nas amostras com défice de três ou mais complexos da CRM, foi estabelecido haver défice generalizado ou múltiplo, respectivamente se estava ou não envolvido o complexo II.

4.2.2 Estudos anatomo-patológicos

As amostras de músculo para estudo histológico foram divididas em três porções: uma conservada em formol, outra, em gluteraldeído e a terceira, enviada a fresco ao laboratório. O fragmento fresco, processado 15-30' após a colheita, foi colocado numa rolha de cortiça e congelado em isopentano arrefecido em azoto líquido (-160°C). Com o criostato foram feitos cortes de 8-10 µm de espessura e aplicadas as diferentes técnicas histoquímicas e histoenzimológicas, a seguir mencionadas. Técnicas histoquímicas:

hematoxilina / eosina – avaliação da estrutura geral do músculo; *Periodic Acid-Schiff (PAS)* - presença de glicogénio; *Oil Red O* – presença de lípidos; Tricrómio Gomori – cora as mitocôndrias, além de outras estruturas como as barras (*rods*) da miopatia da nemalina e vacúolos; permite identificar as fibras vermelhas rotas. Técnicas histoenzimológicas: Nicotinamida Adenina Dinucleótido - *Tetrazolium Reductase (NADH-TR)* - cora as mitocôndrias, retículo sarcoplásmico e túbulos-T; Succinato-desidrogenase (SDH) – identifica as mitocôndrias; SDH modificada– mais sensível do que a anterior, demonstra as fibras com excesso de mitocôndrias; COX - evidencia mitocôndrias; ATPase miofibrilar a pH 4.35 e a 9.4 – permite distinguir os tipos de fibras (Old e Johnson 1989; Dawson et al., 2003).

O fragmento fixado em gluteraldeído a 4% foi dividido em pequenas porções de 1x2mm. Estas foram incluídas em Epon, cortadas em fatias semi-finas, com 0,5 a 1 µm de espessura (Ultramicrótomo e Knifemaker – Leica) e coradas com o azul de toluidina. A partir destes cortes semifinos foram seleccionadas as áreas a estudar em microscopia electrónica, tendo sido feitos cortes ultrafinos (em grelhas de cobre Bio-Rad) contrastados com acetato de uranilo - segundo Valentin e citrato de chumbo - segundo Reynolds (Microscópio Electrónico Jeol - JEM 100S).

As amostras de fígado e miocárdio foram submetidas ao estudo em microscopia óptica. Foram enviadas ao laboratório fixadas em formol e a sua morfologia foi analisada após coloração com hematoxilina-eosina. Técnicas específicas, como a coloração para α 1-antitripsina, foram aplicadas em casos seleccionados.

4.2.3 Estudos de genética molecular

A extracção bem como a quantificação de ácidos nucleicos dos tecidos, essencialmente mtDNA e nDNA, foram efectuadas de acordo com os métodos habituais (Sambrook et al., 1987; Moore et al., 1997).

O estudo do mtDNA foi realizado com recurso a técnicas de *PCR*, (Coen et al., 1997), incluindo a *PCR* de produtos longos (*L-PCR*) (Paul et al., 1996), a *PCR* de flanqueamento de deleções (*FD-PCR*) (Kaluz et al., 1996), a *PCR* específica de mutação (*MS-PCR*) (Wu et al., 1989; Ehlen e Dubeau, 1989; Newton et al., 1989; Kwok et al., 1990), a *PCR-RFLP* ie, com o uso de enzimas de restrição, à electroforese em gel de agarose (Moore et al., 1997) e à sequenciação automática (Ausubel et al., 1997), adaptadas (Grazina, 2004).

As mutações investigadas e as técnicas usadas para a detecção de deleções sofreram uma evolução ao longo do período de estudo (ver Anexos, tabelas 40 a 44, páginas 257-265).

As amostras de DNA foram rastreadas para grandes deleções usando *L-PCR* e, na segunda metade do período de estudo, *FD-PCR*. As mutações pontuais foram

pesquisadas por *MS-PCR* e *PCR-RFLP*. Sempre que foi detectada uma alteração do mtDNA, os produtos em solução foram purificados por electroforese em gel de agarose. A confirmação das alterações encontradas foi feita por sequenciação automática. Na última parte do período do estudo, foi realizado um rastreio alargado de mutações por *PCR* e sequenciação automática. As alterações nele encontradas foram confirmadas por *PCR-RFLP* (Grazina, 2004).

A quantificação do mtDNA foi feita num caso suspeito de depleção com *PCR* em tempo real (*real time PCR*). Em casos seleccionados, foi realizado o estudo de algumas mutações do nDNA associadas a DCRM, nomeadamente os genes *DGUOK* e *SURF1*, por sequenciação.

4.3 Critérios de diagnóstico utilizados

Aplicaram-se retrospectivamente os critérios de DCRM de Walker adaptados a doentes pediátricos pela equipa de Melbourne- critérios de Bernier (Walker et al., 1996; Bernier et al., 2002). Os critérios clínicos e laboratoriais são considerados *majores* ou *minores*, consoante o grau de importância diagnóstica que lhes é atribuída (tabelas 1-4). Alguns critérios não foram usados porque não investigados nos nossos doentes, nomeadamente o crescimento dos fibroblastos em meio com galactose, o estudo em linhas celulares ou a avaliação dos componentes proteicos dos complexos da CRM.

Classificou-se os nossos doentes em quatro grupos de segurança diagnóstica: definido, provável, possível e improvável. **Definido**, se preenchia dois critérios maiores ou um critério *major* e dois critérios menores. **Provável**, se tinha um critério *major* e um *minor* ou pelo menos três critérios menores. **Possível**, se preenchia um *major* ou dois *minor*, um dos quais laboratorial. Quando o doente cumpria apenas critérios menores e não associava critérios clínicos e laboratoriais, foi considerado **improvável** que tivesse uma DCRM (Bernier et al., 2002). De acordo com a existência ou não de um outro diagnóstico etiológico, os doentes foram ainda subdivididos em DCRM primária e secundária.

Analisou-se comparativamente os vários subgrupos diagnósticos finais, com destaque para o com DCRM definida primária.

Com o objectivo de aferir os critérios de diagnóstico utilizados recorreu-se a uma comparação dos resultados assim encontrados nos nossos doentes com os obtidos com a aplicação de parte da escala diagnóstica de DCRM pediátrica do grupo de Nijmegen à nossa amostra.

A escala de Nijmegen utiliza dois conjuntos de critérios, na ausência de diagnóstico molecular: os gerais (subdivididos em três categorias: clínicos, metabólicos/imagiológicos e morfológicos) e os estudos bioquímicos mitocondriais (oxidação de substratos marcados com ^{14}C , produção de ATP e de fosfocreatina e actividade enzimática dos complexos da CRM). Cada um dos grupos de critérios classifica os doentes em DCRM improvável, possível, provável e definida e o diagnóstico final é obtido através do cruzamento dos resultados em cada um dos conjuntos, numa tabela de dupla entrada (Wolf e Smeitink, 2002).

Por limitações metodológicas, foi aplicada à amostra apenas a porção da escala correspondente aos critérios gerais de Nijmegen. Esta valoriza de 0 a 4 pontos três grupos de itens: apresentação clínica (muscular, neurológica ou multissistémica), investigações metabólicas e outras (incluindo a imagem cerebral) e investigação morfológica. As investigações referentes aos critérios sublinhados no quadro não foram feitas em nenhum dos doentes em análise (tabelas 5 e 6).

Tabela 1 - Critérios maiores de diagnóstico de DRCM aplicados aos 200 doentes.

I – CLÍNICOS
<p>1 - Encefalomiopatia clinicamente completa</p> <p>2 - Síndrome de Leigh (encefalopatia necrotisante subaguda)</p> <p>3 - Síndrome de Alpers (poliodistrofia infantil progressiva)</p> <p>4 - Encefalopatia mitocondrial letal infantil/ Miopatia letal infantil (fraqueza severa, generalizada e progressiva, dispneia/polipneia, acidose láctica e envolvimento multissistémico; fatal < 1 ano idade)</p> <p>5 - Síndrome de Pearson (medula – pâncreas)</p> <p>6 - Síndrome de Kearns-Sayre</p> <p>7 - Síndrome <i>MELAS</i> (encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e acidente vascular cerebral)</p> <p>8 - Síndrome MERRF (epilepsia mioclónica e <i>RRF</i>)</p> <p>9 - Síndrome NARP (neuropatia, ataxia e retinite pigmentar)</p> <p>10 - Síndrome MNGIE (doença mioneurogastrointestinal e encefalopatia)</p> <p>11 - LHON (neuropatia óptica hereditária de Leber)</p> <p>12 - Combinação inexplicada de sintomas multissistémicos (pelo menos três órgãos/ sistemas) + Curso clínico progressivo com episódios de exacerbação ou história familiar materna positiva para DRCM provável ou definitiva + Exclusão de outras causas</p>
II- HISTOLÓGICOS
<p>Biópsia músculo esquelético: > 2% de <i>RRF</i></p>
III – ENZIMÁTICOS
<p>1.- >2% de fibras COX negativas numa biópsia muscular (ou 5% se >50 anos de idade)</p> <p>2 - <20% de actividade média do v.r. de qualquer complexo da CRM num tecido</p> <p>3 - <30% de actividade média do v.r. de qualquer complexo da CRM numa linha celular</p> <p>4.- <30% de actividade média do v.r. do mesmo complexo da CRM em >1 tecido</p>
IV- FUNCIONAIS
<p><u>Controlo respiratório ou relação estado 3/ 4: < 3 SD da média</u></p>
V – MOLECULARES
<p>Identificação de alteração do mDNA ou do nDNA de indiscutível patogenicidade.</p> <p>Para o mtDNA, cumprindo os seguintes critérios: 1) heteroplasmia (excepto LHON); 2) presente em níveis significativos; 3) ligação ao mesmo fenótipo em pelo menos dois casos de famílias diferentes; 4) ausência da mutação em saudáveis, excepto familiares assintomáticos; 5) transmissibilidade do defeito da CRM com o mtDNA em híbridos; 6) alteração de aminoácidos, rRNA ou tRNA conservados ao longo da evolução.</p>

Os critérios sublinhados não foram usados. v.r. - valor de referência (adaptado de Bernier et al., 2002)

Tabela 2 - Critérios clínicos *minor* de diagnóstico de DRCM aplicados aos 200 doentes.

I - CLÍNICOS
<p>1- Neurológico</p> <p>1 - Hipotonia ou hipertonia neonatal</p> <p>2 - Alteração da sucção/ dificuldades alimentares no período neonatal</p> <p>3 - Coma cetoacidótico</p> <p>4 - Doença do movimento</p> <p>5 - Ataxia cerebelosa</p> <p>6 - Atraso motor</p> <p>7 - Hipotonia axial</p> <p>8 - Síndrome piramidal</p> <p>9 - Demência ou atraso mental</p> <p>10 - Epilepsia/ mioclonias</p> <p>11 - Episódios do tipo acidente vascular cerebral</p> <p>12 - Neuropatia periférica</p> <p>13 - Apneia recorrente</p> <p>14 - Poliodistrofia</p> <p>15 - Leucodistrofia</p> <p>16 - Episódios de prostração inexplicada e/ou agravamento com infecções intercorrentes</p> <p>2- Muscular</p> <p>1 - Miopatia ocular (oftalmoplegia externa e ptose)</p> <p>2 - Hipotonia e fraqueza muscular progressiva</p> <p>3 - Intolerância ao exercício</p> <p>4 - Atrofia muscular/ emaciação</p> <p>5 - Mialgias/ rabdomiólise (mioglobínúria)</p> <p>6 - Intolerância ao esforço com distrofia muscular</p> <p>3- Cardíaco</p> <p>1 - Defeitos de condução</p> <p>2 - Miocardiopatia hipertrófica ou, mais raramente/, dilatada (fibrose intersticial, fibroelastose)</p> <p>4- Renal</p> <p>1 - Síndrome de Fanconi (frequentemente parcial)</p> <p>2 - Síndrome nefrótico</p> <p>3 - Nefropatia tubulointersticial crónica</p> <p>5- Nutricional</p> <p>1 - Restrição de crescimento intra-uterino</p> <p>2 - Atraso crescimento pós-natal / má progressão ponderal</p> <p>3 - Anorexia severa</p> <p>4 - Vômitos recorrentes</p>

5 - Diarreia crónica com atrofia vilositária e/ou insuficiência pancreática exócrina

6 - Pseudo-obstrução intestinal crónica (no adulto)

6- Hepático

1 - Insuficiência hepática (neonatal severa / tardia).

2 - Elevação das enzimas hepáticas

3 - Esteatose, cirrose, micro ou macronodular

7- Endócrino

1 - Diabetes *mellitus*

2 - Hipoparatiroidismo

3 - Hipotireoidismo

4 - Défice de ACTH

5 - Nanismo (-4 a -6 SD com GH normal; diminuição de IgF1 com alteração do estado redox plasma)

8- Hematológico

Anemia macrocítica / pancitopenia (sideroblastos em anel e vacuolização precursores)

9- Otológico - Surdez neurosensorial

10 - Oftalmológico

1 - Degeneração retiniana / distrofia

2 - Atrofia óptica

3 - Catarata 4 - Opacidade córnea

11- Dermatológico

1- Pigmentação mosqueada das áreas expostas à luz

2 - Acrocianose

3 – Hipertricose 4 - Alopecia

5 - Cabelo anormal (seco, espesso, quebradiço) Pili torti/ trichorrhexis nodosa

6 - Keratoderma palmoplantar (descrito + surdez)

7 - Nevo epidérmico 8 – Ictiose 9 - Colesteatoma

12- Dismorfismo

1 - Facial (associado a microcefalia e atraso de crescimento pré ou pós-natal)

Face redonda, fronte alta, nariz pequeno com filtro achatado e longo; pavilhões auriculares de implantação baixa, angulação posterior com hélix deficiente e lóbulos hipoplásicos

2 - Mãos curtas, braquidactilia, hipoplasia das falanges distal e médias, hipoplasia das unhas

3 - Associação *VATER* (Vertebral, Anal, Traqueo-Esofágico, Renal)

13- Outros

1 - Lipomatose simétrica múltipla

2 - Nado-morto com pobreza de movimentos intra-uterinos na história familiar

3 - Colapso/ morte neonatal na história familiar

Os critérios sublinhados não foram usados.

(adaptado de Bernier et al., 2002)

Tabela 3 - Outros critérios menores de diagnóstico de DRCM aplicados aos 200 doentes.

II - HISTOLÓGICOS	
1	Um a 2% de <i>RRF</i> (30-50 anos de idade)
2	Presença de <i>RRF</i> (< 30 anos de idade)
3	> 2% acumulação mitocondrial subsarcolémica (<16 anos de idade)
4	Alterações mitocondriais difusas na microscopia electrónica em qualquer tecido
III – ENZIMÁTICOS	
1	Demonstração de um defeito de expressão dos complexos da CRM - uso de <i>acs</i>
2	Vinte a 30% da actividade média do v.r. de qualquer complexo da CRM num tecido
3	Trinta a 40% da actividade média do v.r. de qualquer complexo da CRM numa linha celular
4	Trinta a 40% da actividade média do v.r. do mesmo complexo da CRM em >1 tecido
IV - FUNCIONAIS	
1	Controlo respiratório ou relação estado 3/ 4: dois a 3 desvios-padrão abaixo da média
2	Fibroblastos incapazes de crescer num meio sem glicose e com galactose
V.- MOLECULARES	
Identificação de alteração do mDNA não previamente reconhecida como estando associada com o síndrome de apresentação e preenchendo alguns, embora não todos, os seis critérios	
VI - METABÓLICOS	
1	Elevação do lactato, piruvato e/ou alanina (prolina) no líquor e/ou sangue
2	Elevação das proteínas do líquor na suspeita de KSS
3	Alteração metabolismo músculo/ cérebro: ³¹ P-MRS/ PET (<i>Positron Emission Tomography</i>)
4	Diminuição do volume de oxigénio no máximo de exercício (VO_{2max}), da diferença arterio-venosa de oxigénio (AVO_{2D}) ou do limiar para lactato na ergonomia (não explicados pela falta de exercício)

Os critérios sublinhados não foram usados. v.r. - valor de referência (adaptado de Bernier et al., 2002)

Tabela 4 - Graus de diagnóstico final de DRCM segundo a classificação de Bernier.

DEFINIDO	2 maiores ou 1 major + 2 menores
PROVÁVEL	1 major + 1 minor ou ≥ 3 menores
POSSÍVEL	1 major ou 2 menores (um dos quais laboratorial)
IMPROVÁVEL	2 menores (ambos clínicos ou laboratoriais) ou 1 minor

(adaptado de Bernier et al., 2002)

Tabela 5 - Critérios *gerais* de DCRM de Nijmegen.

I – Clínicos (máximo: 4 pontos)
A - Apresentação muscular – sinais e sintomas musculares (máximo: 2 pontos)
<p>1- Oftalmoplegia externa progressiva (2 pontos)</p> <p>2- Ptose, facies miopática (1 ponto)</p> <p>3- Intolerância ao exercício (fadiga prematura ou anormal, fraqueza, dores musculares ou caimbras após actividades normais da vida diária) (1 ponto)</p> <p>4- Diminuição da força muscular (evidenciada por testes formais, se possível, ou sinal de Gowers positivo ou ausência/ diminuição do controlo cefálico ou atraso do desenvolvimento motor – os últimos só se o desenvolvimento mental for normal ou muito avançado em comparação com o motor) OU hipotonia muscular (no período neonatal e até uma idade de neurodesenvolvimento de 6 meses, com queda da cabeça no teste de tracção, controlo cefálico pobre, <i>deixar-se deslizar</i> quando suspenso pelas axilas, postura em rã dos membros inferiores quando acordado e cabeça e membros pendentes quando em suspensão ventral) (1 ponto)</p> <p>5- Episódios de rabdomiólise aguda (episódios agudos com dor muscular severa, fraqueza muscular, elevação excessiva da creatina cinase - CK- ou mioglobínúria) (1 ponto)</p> <p>6- Electromiograma anormal (ligeiras alterações miopáticas: potenciais de acção da unidade motora de amplitude e duração reduzidas ou com recrutamento precoce ou redução da amplitude e duração dos potenciais de acção da unidade motora com aumento do número de potenciais polifásicos).</p>
<p>Qualquer outro envolvimento: SNC (máximo: 1 ponto) ou multissistémico (máximo:2 pontos) – máximo 2 pontos (ver aquelas estas secções).</p>
B - Apresentação do SNC (máximo: 2 pontos, 1 ponto cada)
<p>1 - Atraso ou ausência de desenvolvimento psicomotor (atraso significativo em duas ou mais áreas do neurodesenvolvimento: motricidade grosseira e fina, cognição, fala/linguagem, pessoal/social ou actividades da vida diária, tal como demonstrado em testes de rastreio) ou atraso mental (QI <70)</p> <p>2 - Perda de capacidades adquiridas</p> <p>3 - Episódios tipo acidente vascular cerebral (hemianópsia, hemiplegia transitórias etc.)</p> <p>4 - <i>Migraine</i></p> <p>5 - Convulsões francas ou electroencefalograma anormal (lentificação da actividade de base, actividade epileptiforme generalizada, ou lentificação ou actividade convulsiva focais)</p> <p>6 - Mioclonias ou epilepsia mioclónica</p> <p>7 - Cegueira cortical (perda de visão e nistagmo optocinético num doente com o restante exame visual normal e respostas pupilares à luz intactas)</p> <p>8 - Sinais e sintomas piramidais (hipertonía muscular, opistótonus, hiperreflexia osteotendinosa, Babinsky, etc)</p> <p>9 - Sinais e sintomas extrapiramidais (atetose, distonia, movimentos involuntários)</p>

<p>10 - Sinais e sintomas de lesão do tronco cerebral (distúrbios autonómicos como apneias centrais, hipoventilação central, bradicardia ou taquicardia sinusal; dificuldades na deglutição, nistagmo, estrabismo; ondas III a V anormais ou ausentes nos potenciais evocados auditivos)</p> <p>11 - Sinais/sintomas de envolvimento cerebeloso (ataxia, tremor intencional, disdiadococinesia...)</p>
<p>Qualquer outro envolvimento – músculo (máximo 1 ponto) ou multissistémico (máximo 2 pontos) – máximo 2 pontos (ver aquelas estas secções).</p>
<p align="center">C - Envolvimento multissistémico (máximo: 3 pontos, 1 ponto cada sistema)</p>
<p>Hematológico</p> <p>1 - Anemia sideroblástica; 2 - Pancitopenia</p> <p>Tracto gastrointestinal</p> <p>1 - Alteração aguda ou crónica da função hepática (elevação das enzimas hepáticas, diminuição da síntese de proteínas hepáticas, diminuição da excreção de bilirrubina, hipoglicémia)</p> <p>2 - Má progressão ponderal (insuficiente aumento de peso, peso abaixo do P3, ou -2DP ou a cruzar percentis).</p> <p>3 - Alteração da função pancreática exócrina (> 7% excreção de gordura)</p> <p>4 - Pseudo-obstrução intestinal (obstipação, dor tipo cólica e vómitos, sem obstrução orgânica)</p> <p>5 - Diarreia crónica, sem outra causa conhecida (> 3 semanas)</p> <p>Endócrino</p> <p>1 - Baixa estatura (<-2 DP ou < P3)</p> <p>2 - Atraso pubertário</p> <p>3 - Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 ou tipo 2 ou redução da tolerância à glicose</p> <p>4 - Hipoparatiroidismo 5 - Diabetes insípida central</p> <p>Cardíaco</p> <p>1 - Miocardiopatia (hipertrofica ou dilatada) na ausência de <i>vitium cordis</i> ou hipertensão</p> <p>2 - Bloqueio de condução (aurículo-ventricular I a III, de ramo, síndromes de pré-excitação)</p> <p>Renal</p> <p>1 - Tubulopatia proximal (síndrome de Fanconi completo ou parcial)</p> <p>2 - Glomerulosclerose focal e segmentar (biópsia)</p> <p>Oftalmológico</p> <p>1 - Catarata 2 - Atrofia óptica 3 - Retinopatia (electrorretinograma)</p> <p>Audição - Surdez neurosensorial</p> <p>Nervo - Neuropatia periférica</p> <p>Geral</p> <p>1 - Exacerbação dos sinais e sintomas anteriores com doenças intercorrentes banais</p> <p>2 - Morte neonatal ou infantil, súbita, inexplicada na história familiar</p>
<p>Qualquer outro envolvimento – músculo ou SNC – máximo 1 ponto (ver aquelas secções)</p>

Critérios gerais de DCRM de Nijmegen (continuação)

II - Investigação metabólica e outras (máximo: 4 pontos)

- 1 - Lactato plasma > 2000 µmol/l (espontâneo, pós-prandial ou teste de tolerância à glicose oral) em pelo menos três ocasiões (2 pontos)
- 2 - Aumento da razão lactato/piruvato > 18 (só se o lactato estiver elevado) (1 ponto)
- 3 - Aumento da alanina (plasma) > 450 µmol/l (2 pontos)
- 4 - Aumento do lactato do *líquor* (> 1800 µmol/l, pontua só se o lactato do plasma é normal) (2 pontos)
- 5 - Aumento das proteínas do *líquor* (1 ponto);
- 6 - Aumento da alanina do *líquor* (2 pontos)
- 7 - Urina: aumento da excreção de lactato ou intermediários do ciclo de Krebs (2 pontos)
- 8 - Aumento da excreção dos ácidos etilmalónico ou 3-metilglutacónico ou dicarboxílicos (adípico, subérico, sebácico) (1 ponto)
- 9 - Aumento do Pi e redução da razão fosfocreatina/ Pi no músculo (³¹P RMS) (2 pontos)
- 10 - RMN: síndrome de Leigh (lesões hiperintensas em T2 a nível dos putamina, globos pálidos, núcleos caudados) (2 pontos)
- 11 - RMN: lesões do tipo das do acidente vascular cerebral -AVC - (não confinadas a um território vascular) ou leucodistrofia ou atrofia cerebral/cerebelosa (1 ponto);
- 12 - ¹H-RMS cerebral: pico de lactato claramente visível (1 ponto)

III -Morfologia (máximo: 4 pontos)

- 1 - Fibras vermelhas rotas (*Ragged Red Fibres - RRF*) ou fibras azuis rotas (*Ragged Blue Fibres- RBF*): se presentes num doente pediátrico =2 pontos; se ≥ 2 % =4 pontos
- 2 - Fibras COX-negativas: se presentes num doente pediátrico =2 pontos, se ≥2%=4 pontos
- 3 - Coloração pela COX globalmente muito reduzida (excluídos problemas técnicos) (4 pontos)
- 4 - Coloração pela SDH anormal (reduzida ou irregular) (1 ponto)
- 5 - Vasos sanguíneos fortemente corados pela SDH (2 pontos)
- 6 - Microscopia electrónica: mitocôndrias anormais (máximo 2 pontos): agregados sub-sarcolémicos ou intermiofibrilares de mitocôndrias (1 ponto); mitocôndrias alargadas ou alongadas (2 pontos); aumento das cristas com orientação irregular, padrão em favo de mel, rodas concêntricas ou pobreza de cristas (no último caso- aspecto vacuolar/ vazio das mitocôndrias) (2 pontos); inclusões mitocondriais anormais (cristalinas, globulares) (2 pontos); gotículas lipídicas (1 ponto)

Os critérios sublinhados não foram usados.

(adaptado de Wolf e Smeitink, 2002)

Tabela 6 - Graus de diagnóstico segundo os critérios *gerais* de DCRM de Nijmegen.

Pontuação total	Grau de diagnóstico
8 – 12 pontos	<i>Definido</i>
5 – 7 pontos	<i>Provável</i>
2 – 4 pontos	<i>Possível</i>
1 ponto	<i>Improvável</i>

(adaptado de Wolf e Smeitink, 2002)

Realizou-se a análise de concordância entre as classificações obtidas com os critérios gerais de Nijmegen e com a escala de Bernier adaptada, isto é, sem os estudos funcionais e moleculares da CRM, não constantes da primeira, relativamente aos 200 doentes e a subgrupos específicos.

Fez-se ainda a análise de concordância entre as diferentes formas de traduzir o resultado da actividade enzimática (< 20% e < 30% da média do v.r. e inferior ao limite inferior do normal, com ou sem *normalização* para a citrato sintase) e os níveis de diagnóstico obtidos pela aplicação à amostra dos critérios gerais de Nijmegen. Comparou-se o grupo Definido com Outros e com Possível/Improvável e o grupo Definido/Provável com Outros, com os valores funcionais expressos nas diferentes unidades.

4.4 Incidência e prevalência na Região Centro de Portugal

Fez-se a estimativa da incidência e prevalência de DCRM na Região Centro de Portugal. Excluíram-se 16 dos 78 doentes com o diagnóstico de DCRM definida primária por terem nascido fora da Região Centro.

A incidência de DCRM com manifestação clínica na primeira década de vida foi calculada pela razão entre o número de crianças com DCRM e o número de nado-vivos na Região Centro de Portugal no período de 1989-1996 (oito anos).

A prevalência pontual foi determinada pelo quociente entre o número de doentes com menos de 10 anos de idade, vivos em 31 de Dezembro de 2006, e o número de crianças da mesma idade residentes na Região Centro de Portugal em 2006.

4.5 Análise estatística

A análise estatística deste trabalho foi efectuada com o apoio dos *softwares SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* e *Stata (Data Analysis and Statistical Software)*.

Na estatística inferencial foram usados apropriadamente os testes do χ – quadrado, o teste *T-Student* e ANOVA de um factor. Foi feita também análise de sobrevivência com curvas de *Kaplan Meier* e testes de *Log-Rank*.

Na análise de concordância, o valor de *Kappa* foi valorizado do seguinte modo: <0 – sem concordância; 0,0-0,2 - concordância muito baixa; 0.21 – 0.40 baixa; 0.41 – 0.60 moderada; 0.61 – 0.80 total/ completa; 0.81 – 1.00 – quase perfeita.

Em toda a análise estatística realizada utilizou-se como nível de significância $p=0.05$. Para não tornar a análise estatística dos resultados pesada e repetitiva, sempre que se indica existir diferença/relação entre duas variáveis essa diferença/relação é estatisticamente significativa.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização clínico-laboratorial da amostra

5.1.1 A clínica das crianças com suspeita de doença mitocondrial

De 1997 a 2006 (10 anos) foram investigados no HP 200 doentes com clínica sugestiva de DCRM, através de análise de tecidos (músculo esquelético, fígado e/ou miocárdio). Cento e cinco doentes (52,5%) eram do sexo masculino, com uma relação masculino / feminino 1,1:1.

A distribuição dos casos investigados ao longo dos anos em que o estudo decorreu, sendo o ano referenciado pela data da colheita de tecidos para estudo mitocondrial, está representada na figura 10.

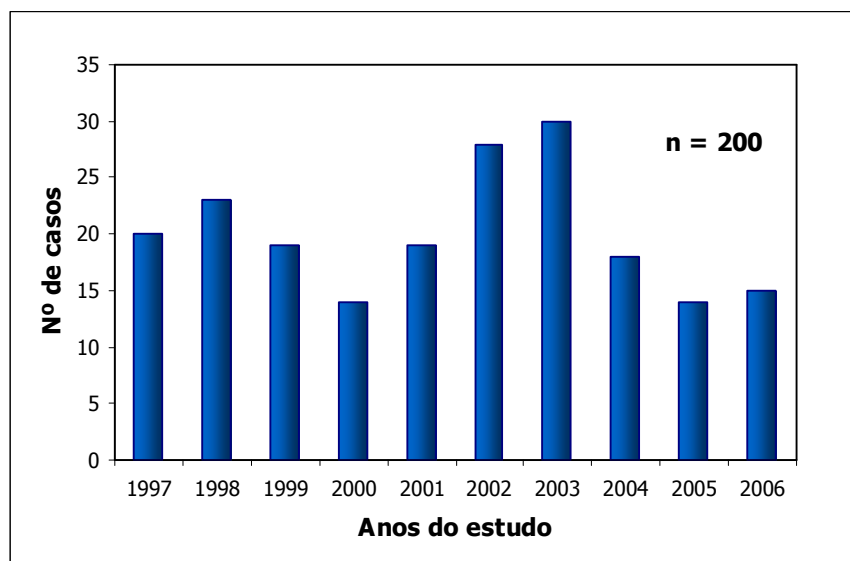


Figura 10 - Distribuição dos casos investigados por anos do período de estudo.

Apresentação clínica

As 200 crianças, todas de raça caucasiana, faziam parte de 196 famílias (quatro pares de irmãos). Havia consanguinidade em 16 famílias (8%), em primeiro grau em três casos. Registou-se uma história de morte inesperada de familiares próximos em 47 famílias (24%), mais de um terço das quais (38%), no período neonatal e mais de metade (60%) nos dois primeiros anos de vida. Em duas famílias, o pai tinha falecido subitamente.

Constatou-se doença relevante nos progenitores em 52 famílias (19 pais e 41 mães). Nestas, a doença era do foro neurológico em 17, psiquiátrico em 9 e endócrino em 4. Havia antecedentes mórbidos significativos em 110 famílias (56%): 85 (77%) e 55 (50%), nas linhas materna e paterna respectivamente.

Tratava-se de um primeiro filho em 90 casos (46%) e do único filho à época da investigação, em 60 (31%). Em 12 casos (6%) havia história de irmãos falecidos. Dos 140 doentes com irmãos vivos, 19 tinham irmãos com patologia relevante (14%).

Quarenta e seis crianças (23%) tinham nascido fora da Região Centro. Quarenta e sete doentes (24%) pertenciam ao distrito de Coimbra (figura 11).



Figura 11 - Mapa de distribuição dos doentes por distrito.

O número de doentes em cada um dos distritos está sinalizado.

Oitenta e seis doentes (43%) eram fruto de uma primeira gestação. A gestação tinha sido considerada de risco por morte pré-natal anterior em 12 casos (6%). Tinham ocorrido complicações na gravidez em 54 casos (27%): ameaça de abortamento em duas gestações e de parto prematuro em 12; doença materna em 28 (hipertensão arterial, pré-eclâmpsia e/ou colestase gravídica em sete e infecções não urinárias em seis) e doença fetal em 11 (hidrâmnios: 5). Havia referência a diminuição dos movimentos fetais em 10 casos.

Vinte e nove partos (15%) foram de pré-termo. O parto foi distócico em 77 casos (39%), motivando fórceps ou ventosa em 19 (10%) e cesariana em 58 (29%).

Dezanove recém-nascidos (10%) tiveram critérios de asfixia perinatal. Tinha sido feita reanimação com entubação traqueal e ventilação assistida em 14 recém-nascidos e com

máscara e oxigénio em 22. Sessenta e três recém-nascidos (32%) tinham tido internamento neonatal superior ao habitual: 22 até uma semana e 10, por mais de um mês.

Em 153 casos (76,5%) a clínica de apresentação foi predominantemente NM e os 47 restantes (23,5%) apresentaram-se com sinais de outro tipo, ENM., como atraso de crescimento e/ou alterações hepáticas, cardíacas, oftalmológicas ou multissistémicas.

A idade de apresentação clínica variou entre o primeiro dia de vida e os 9 anos de idade, com uma média de 10 meses e uma mediana de 3 meses. Na tabela 7 relaciona-se a idade de início com o tipo de apresentação.

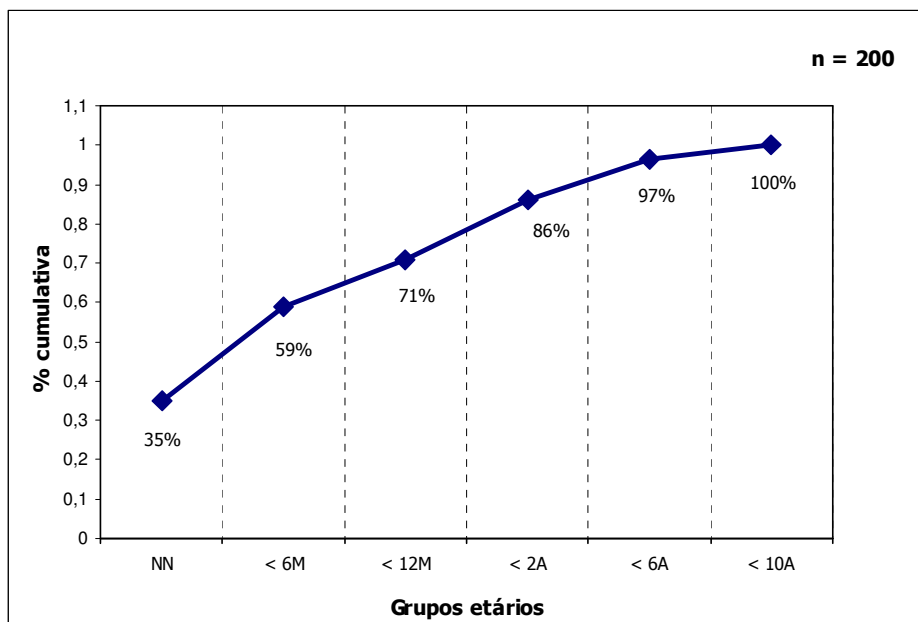


Figura 12 - Idade de início de manifestações clínicas nos vários grupos etários

Abreviaturas: NN- período neonatal; <6M - primeiro semestre de vida; <12M – primeiro ano (lactente); < 2 A – primeiros dois anos; <6 A – primeiros 6 anos; <10 A – primeira década de vida; M- meses de vida; A- anos de vida.

Tabela 7 - Relação entre a idade e o tipo de apresentação clínica em 200 doentes.

Idade início	nº	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP (A)
Total	200	1ºd	9 A	3 M	10M	1,46
ENM	47	1ºd	9 A	1M	11M	1,99
NM	153	1ºd	8 A	3M	9M	1,25

Abreviaturas: 1ºd – primeiro dia de vida; M- meses de vida; A- anos de vida

Cerca de um terço das crianças (35%) teve manifestações clínicas no período neonatal e 59%, no primeiro semestre de vida. A quase totalidade dos doentes (96,5%) apresentou-se nos primeiros cinco anos e todos antes dos 10 anos de idade (figura 12).

No que diz respeito às circunstâncias da apresentação clínica, o grupo de 200 doentes foi subdividido em dois, como referido na tabela 8, com implicações no diagnóstico e no prognóstico: doentes crónicos (148/200; 74%), que representam 82% dos casos NM e 47% dos ENM; doentes agudos - crianças previamente saudáveis (32) ou com doença crónica (20) que sofreram um episódio mórbido agudo, fatal ou altamente incapacitante: 26% da amostra total (52/200) e que corresponde a 18% dos NM e 53% dos ENM. Inclui três casos de morte súbita, uma aos 21 meses de idade em criança com atraso de crescimento desde os cinco meses e duas, em crianças anteriormente saudáveis, aos 4 meses e aos 4 anos, respectivamente.

Tabela 8 - Relação entre a idade de início dos sintomas e o tipo de clínica na altura do estudo.

Idade início	nº	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP (anos)
Crónico	148	0 dias	8 A	4M	10M	1,29
Agudo	52	0 dias	9 A	14 dias	9M	1,87

Abreviaturas: M- meses de vida; A- anos de vida; Crónico – doente crónico, sem agudização; Agudo - episódio agudo, fatal ou altamente incapacitante em criança saudável ou com doença crónica.

Cinquenta crianças tinham apresentado alterações pré-natais: restrição de crescimento intra-uterino (26), malformações (25) e/ou dismorfismos (12); miocardiopatia dilatada com diagnóstico pré-natal (um); taquicardia fetal com hidropisia tratada in útero (um). As malformações mais frequentes (figuras 13 e 14) foram do foro ortopédico (luxação congénita da anca: cinco; malformação dos pés: quatro, artrogripose: três) ou cardiovascular (comunicação interauricular: quatro; comunicação interventricular: três; artéria umbilical única: dois; *cor triatrium*: um; malformação dos grandes vasos: um).

A restrição de crescimento intra-uterino era simétrica em nove recém-nascidos e assimétrica nos restantes (11 ponderais e do comprimento, em seis). Dos 144 casos com acesso ao registo do perímetro cefálico ao nascimento, em três havia microcefalia, todos com atraso de crescimento simétrico. Registou-se macrossomia num caso.

Das 50 crianças com alterações clínicas pré-natais, 33 (67%) tiveram sintomas que motivaram cuidados médicos no período neonatal, nove no primeiro semestre de vida e duas, no segundo semestre.

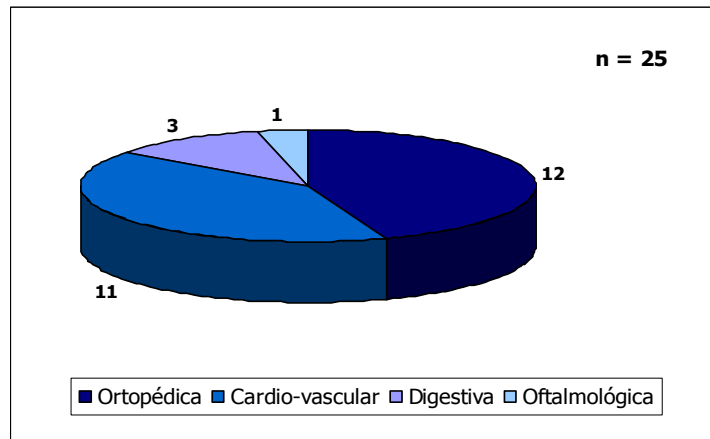


Figura 13 - Malformações congénitas na amostra em estudo.



Figura 14 - Pé convexo num dos doentes da nossa série.

Na figura 15 estão representados os sinais e sintomas mais frequentes na apresentação no grupo NM (153 doentes): atraso e/ou regressão do desenvolvimento psicomotor em 77 doentes (50%), hipotonia muscular em 62 doentes (41%), miopatia em 35 doentes (23%) (sendo manifestação clínica isolada em três casos) e convulsões em 32 doentes (21%).

Como discriminado na tabela 9, foram encontradas outras alterações do exame neurológico em 14 doentes (9%). Observaram-se ainda outros sinais e sintomas, nomeadamente, apneias em nove crianças (6%), alterações da sucção/deglutição em nove doentes (6%) e estrabismo em oito doentes (5%). Havia atraso do neurodesenvolvimento em 66 (43%) e regressão em 11 (7%) doentes. O atraso era global em 40 crianças, da linguagem em 17 e de predomínio motor, em nove.

As manifestações ENM, forma de apresentação em 47 crianças, seis das quais foram objecto de publicação (Diogo et al., 1998), consistiram em: atraso de crescimento pós-natal (19 com má progressão ponderal, dos quais seis com atraso estatural), cardiopatia (11), doença hepática (10), alterações metabólicas sintomáticas (nove) [acidose láctica (seis), hipoglicémia (cinco)], défice visual (seis), digestiva (cinco) [vómitos persistentes ou cíclicos (quatro) diarreia crónica (um)], pancitopenia (três), morte súbita (dois) e eczema grave (um) (figura 16).

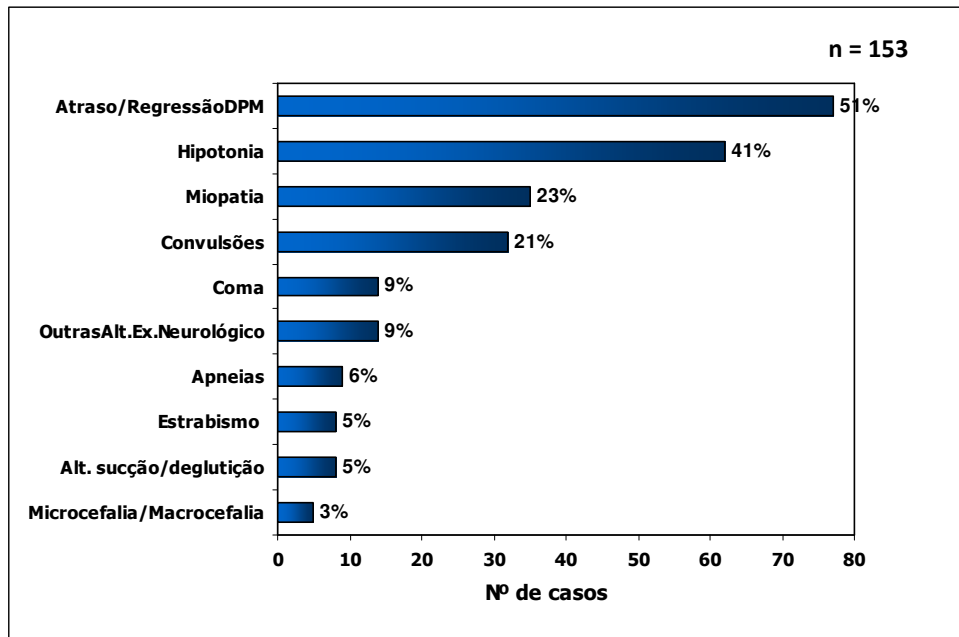


Figura 15 - Sinais e sintomas de apresentação neurológica e/ou muscular em 153 doentes.

Abreviaturas: OutrasAlt.Ex.Neurológico- outras alterações do exame neurológico; Alt.- alterações

Tabela 9 - Apresentação clínica – outras alterações neurológicas em 14 doentes.

Outras alterações exame neurológico	
Ataxia	6
Síndrome piramidal	4
Distonia	2
Tremor	1
Paralisia flácida	1
Total	14

Como se pode ver na figura 16, a apresentação cardíaca ocorreu em 23% dos casos com manifestações clínicas iniciais ENM (11 doentes), sendo a miocardiopatia dilatada a alteração mais frequentemente observada (figuras 17 e 18).

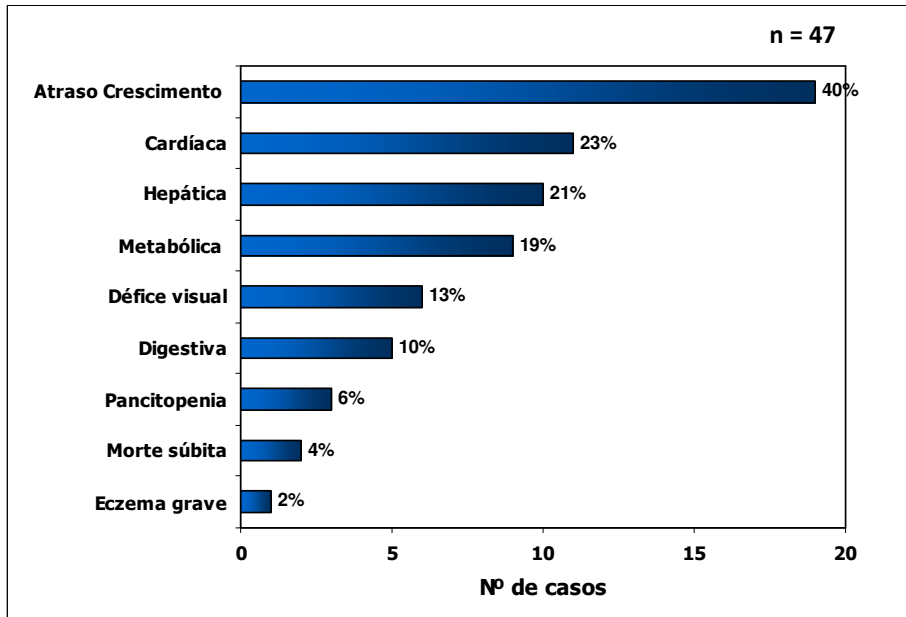


Figura 16 - Sinais e sintomas de apresentação ENM em 47 doentes.

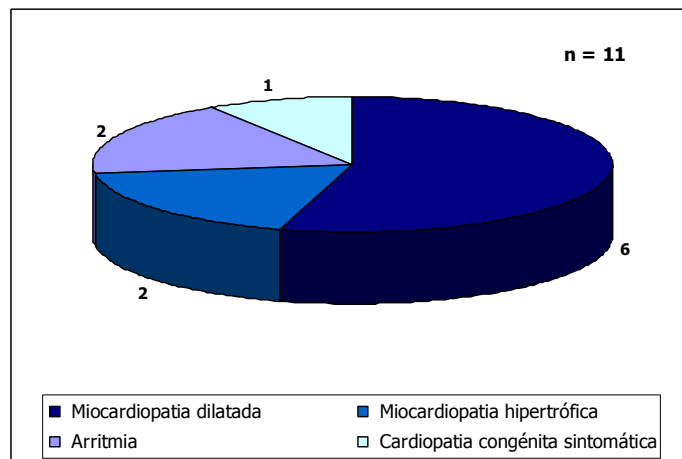


Figura 17 - Apresentação cardíaca observada em 11 doentes.



Figura 18 - Cardiomegália num doente com miocardiopatia dilatada

Dez doentes apresentaram clínica inicial do foro hepático (figura 19).

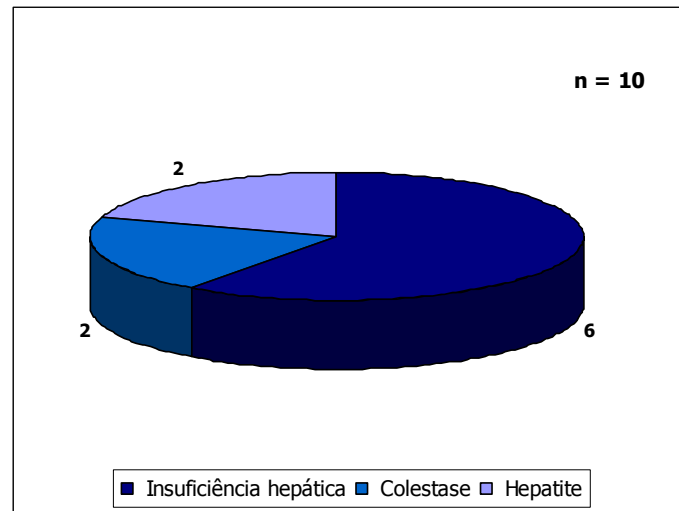


Figura 19 - Apresentação hepática observada em 10 doentes.

Evolução

A evolução foi rapidamente fatal (em menos de uma semana) em nove doentes: quatro (3%) dos do grupo NM e cinco (11%) dos do ENM. Este grupo inclui dois recém-nascidos cuja apresentação foi aguda e a evolução rapidamente fatal. A morte foi retrospectivamente atribuída a choque hemorrágico por descolamento da placenta, num e a choque séptico, no outro.

Durante o período do estudo foi perdido o seguimento de três doentes, 2 a 9 anos após a biópsia, pelo que foram incluídos na análise da sintomatologia de evolução.

A sintomatologia nas crianças que sobreviveram à primeira semana de doença (191) está representada na figura 20.

Em 41 das 149 crianças (28%) do grupo NM que sobreviveram à primeira semana, surgiram alterações ENM. Nas restantes 108, o quadro clínico manteve-se NM.

Em 31 (74%) dos 42 doentes do grupo ENM que sobreviveram à primeira semana houve posterior envolvimento NM. Assim, em 180 de todas as crianças (191) sobreviventes à primeira semana de doença (94% destes casos) assistiu-se a uma evolução com atingimento NM (figura 20).

Constatou-se evolução multissistémica em 44 (23%) dos doentes que ultrapassaram a primeira semana de doença.

Como se pode observar na figura 20, as alterações do foro neurológico prevaleceram (92% dos casos), destacando-se o atraso e/ou regressão do desenvolvimento psicomotor em 154 destes doentes (88%) (figura 21).

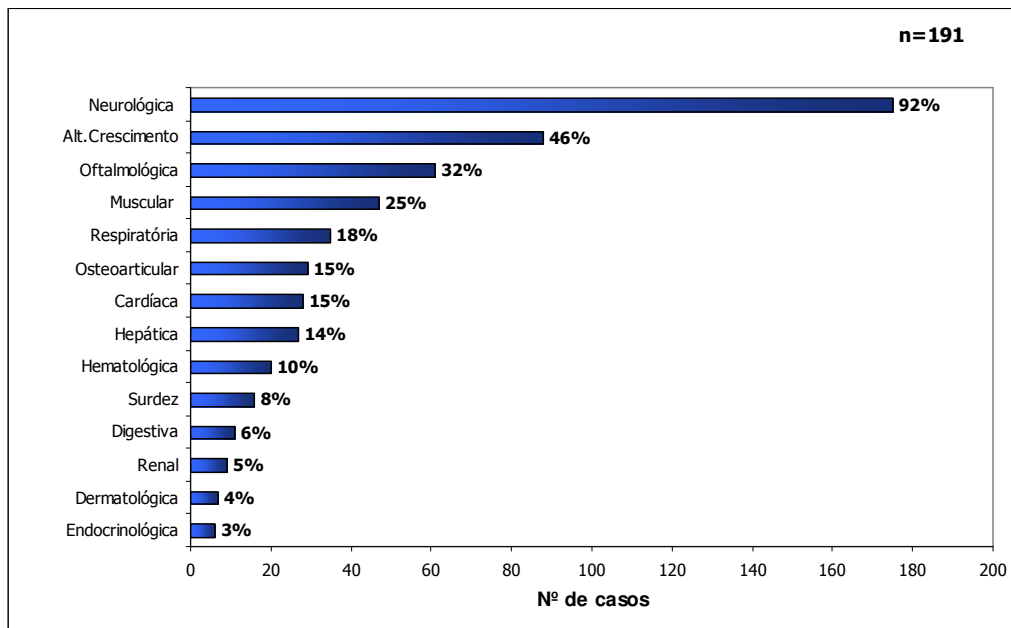


Figura 20 - Evolução clínica das 191 crianças sobreviventes à primeira semana de doença.

Oftalmológica - inclui 29 casos com estrabismo, oftalmoplegia e/ou ptose, sem déficit visual
 Abreviaturas: Alt.Crescimento- alteração do crescimento.

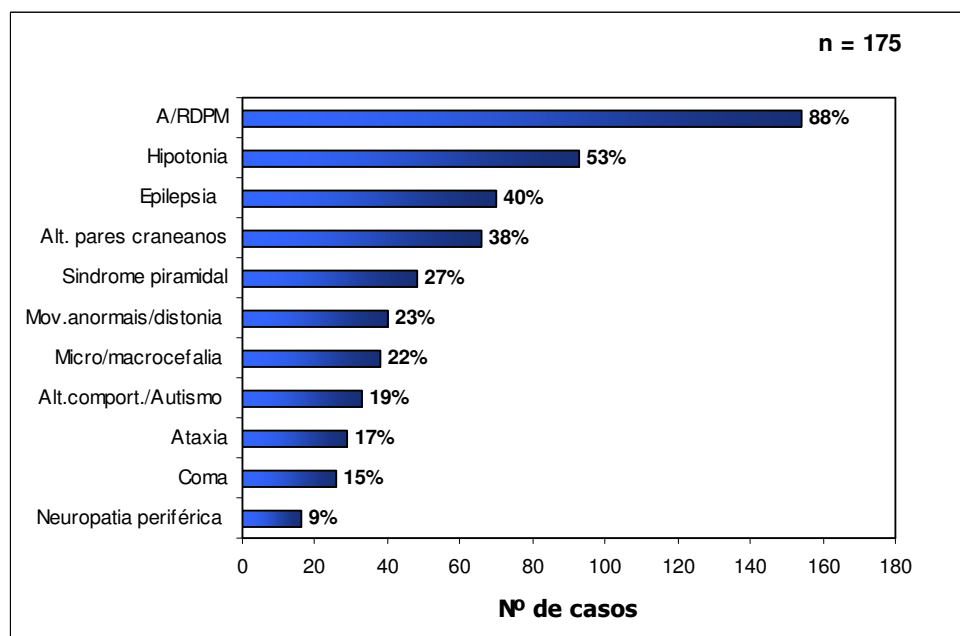


Figura 21 - Evolução neurológica em 175 crianças sobreviventes à primeira semana de doença.

Abreviaturas: A/RDPM - atraso e/ou regressão do desenvolvimento psicomotor: 119 crianças apresentaram atraso, 24 atraso e regressão e 11, regressão do desenvolvimento psicomotor. Hipotonia muscular foi observada em 93 doentes, sendo generalizada em 55 doentes e axial em 38 doentes. Mov. anormais / Distonia: movimentos anormais em 28 doentes e distonia em 20 doentes. Micro/ Macrocefalia: microcefalia 33 crianças e macrocefalia em cinco. Alt.comport./ Autismo: alterações comportamento- 24 doentes e perturbação do espectro autista - 20 crianças.

Em 24 dos 35 casos de regressão havia um período de atraso de desenvolvimento psicomotor prévio. A avaliação do neurodesenvolvimento foi realizada com a escala de *Growing Skills* na maior parte dos casos (139). O atraso de desenvolvimento psicomotor, identificado em 154 crianças, foi classificado em ligeiro, moderado, severo e profundo em 35, 31, 37 e 51 casos, respectivamente (figura 22).

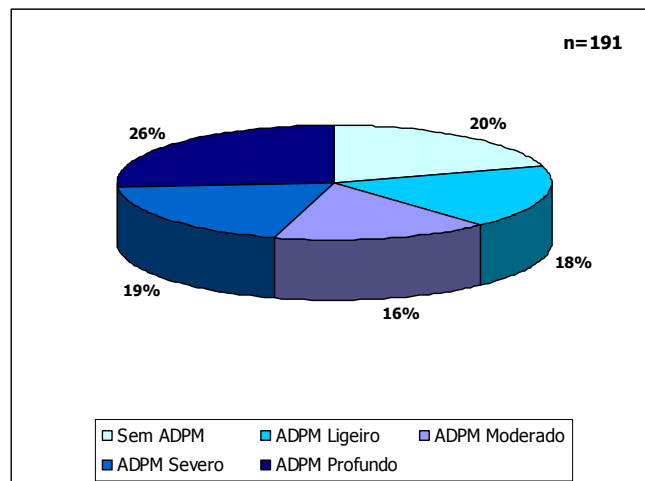


Figura 22 - Desenvolvimento psicomotor nos sobreviventes à primeira semana de doença.

Abreviaturas: ADPM- atraso de desenvolvimento psicomotor.

Setenta crianças apresentaram epilepsia. A figura 23 mostra uma criança com epilepsia refractária e regressão do desenvolvimento psicomotor.

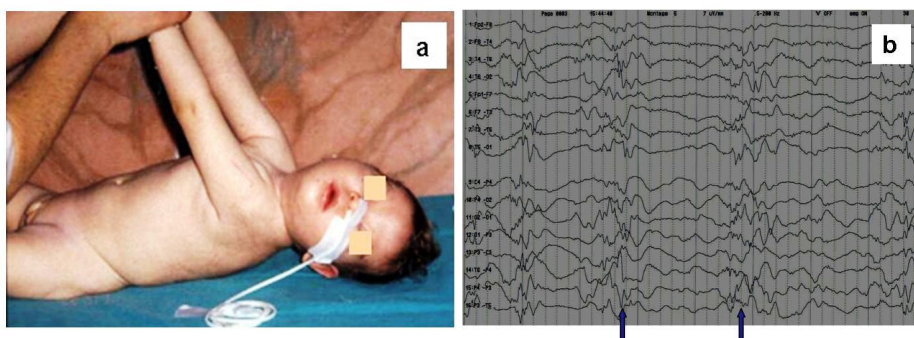


Figura 23 - Criança com encefalopatia epilética (síndrome de West).

Note-se a hipotonia axial marcada e a necessidade de alimentação por sonda nasogástrica (a) e o electroencefalograma com graves alterações do ritmo de base, padrão periódico (de surto-supressão), tanto durante a vigília como no sono, em que os surtos correspondem frequentemente a espasmos, assinalados com setas (b).

A classificação da epilepsia dos nossos doentes está resumida na tabela 10. Dos 33 doentes que apresentaram convulsões no início da doença, todas evoluíram para epilepsia, com excepção de uma que sofreu encefalopatia aguda fatal.

Apenas seis das 70 crianças com epilepsia não sofreram de atraso e/ou regressão do desenvolvimento psicomotor.

Tabela 10 - Classificação da epilepsia em 70 doentes investigados por suspeita de DCRM.

EPILEPSIAS		n=70
1. Parciais		
1.2 Sintomáticas	1.2.1/2 Frontotemporal	2
	1.2.3 Lobo occipital	1
2. Generalizadas		
2.1 Idiopáticas	2.1.4 E. de ausências da criança	3
	2.1.8 Outras não definidas	4
2.2 Criptogénicas ou sintomáticas		
	2.2.1 S.West	7
	2.2.2 S.Lennox-Gastaut	1
	2.3.1 Sint. etiologia não especif.	9
	2.3.2 Sint. síndromes específicos	6
3. Indeterminadas*		
3.1 Com crises parciais e generalizadas	3.1.1 Crises neonatais	9
	3.1.2 E. mioclónica grave lactente	1
	3.1.5 Outras indeterminadas	6
3.2 Sem características inequívocas*		14
4. Síndromes especiais		
4.2 Crises/estados mal epiléptico isolados		5
4.3 Crises em acontecimento agudo		2

*quanto a serem parciais ou generalizadas.

Abreviaturas: E.- Epilepsia; Sint.- sintomáticas; especif. –especificada.

Registou-se evolução microcefálica e macrocefálica em 33 e 5 crianças, respectivamente, todas com atraso e/ou regressão do desenvolvimento psicomotor.

Dos 26 casos que evoluíram para coma, em sete este foi causado por insuficiência hepática fatal.

Transtornos da motilidade oral e/ou facial e da sucção/ deglutição, de fisiopatologia complexa, eventualmente atribuíveis a lesão dos nervos cranianos, foram registados em

66 casos, sendo as alterações da sucção/deglutição (44 crianças) e o estrabismo/oftalmoplegia (estrabismo-24; oftalmoplegia-14; ambos-dois casos) os mais frequentes (figura 24). Em 21 doentes havia associação de um ou mais sinais ou sintomas.

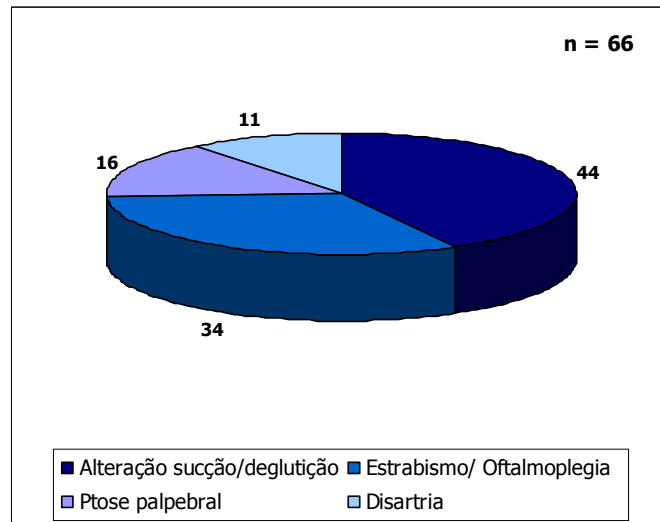


Figura 24 - Sintomatologia atribuível a alteração dos pares cranianos.

Vinte crianças apresentaram disfunção do espectro autista. Vinte e quatro doentes sofreram alterações do comportamento que justificaram intervenção farmacológica específica.

Foi demonstrada neuropatia periférica por meios electrofisiológicos e/ou histológicos em 16 das 29 crianças que apresentaram clinicamente ausência de reflexos osteotendinosos ou hiporreflexia acentuada.



Figura 25 - Malnutrição (a); alimentação por gastrostomia (b) em crianças da nossa série.

Em 88 dos 191 casos com mais de uma semana de evolução assistiu-se a transtornos do crescimento, mormente atraso ponderal (75 casos) e/ou estatural (68 casos), por vezes grave, como se ilustra na figura 25a. Em nove dos 169 casos que sobreviveram mais de seis meses foi realizada gastrostomia para alimentação (figura 25b). Registou-se excesso de peso em cinco crianças.

Em 61 doentes foram assinalados problemas oftalmológicos distintos de alterações da refacção. Em 29 destes casos, havia transtorno dos nervos oculomotores aparentemente isolado (isto é, ptose palpebral, estrabismo e/ou oftalmoplegia). Na figura 26 mostra-se três dos nossos doentes na posição de máxima abertura dos olhos (a, b, c; note-se a inclinação da cabeça para trás no caso b), tendo o caso (c) igualmente oftalmoplegia total. Nos outros 32 doentes foi detectada lesão oftalmológica com ou sem alteração dos nervos oculomotores: atrofia óptica, tal como a ilustrada na figura 26d (em 12 crianças), nistagmo (em nove), retinopatia (em nove) apraxia ocular (em seis) e outras alterações (em três).

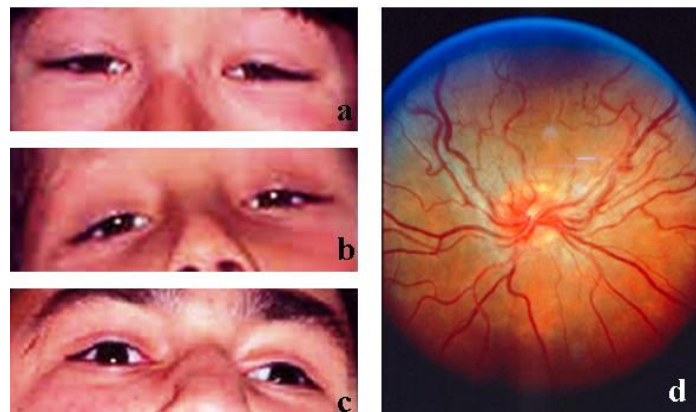


Figura 26 - Envolvimento oftalmológico em três doentes da nossa série

(a e b) ptose palpebral bilateral; (c) - oftalmoplegia; (d) atrofia óptica.

Havia evidência clínica de sofrimento muscular em 47 doentes, com diminuição da força muscular em 44, hipotrofia marcada das massas musculares (não justificada pela desnutrição e/ou alterações neurológicas) em 24 e mialgias e/ou intolerância ao exercício (não provocada directamente por insuficiência cardiorespiratória) em 19 (cinco dos quais com episódios de mialgias, sem mioglobínúria).

As alterações do foro respiratório e ortopédico estiveram frequentemente relacionadas com o quadro neurológico: pneumonias de repetição em 14 crianças; apneias e/ou insuficiência respiratória em 26 casos, oito dos quais com apoio ventilatório domiciliário; complicações ortopédicas em 26 doentes, consistindo em luxação coxofemoral e/ou escoliose, *paralíticas*, em 23.

A miocardiopatia hipertrófica foi a manifestação cardíaca mais frequente durante a evolução (15 casos num total de 29 com envolvimento cardíaco). Oito crianças sofreram de insuficiência cardíaca secundária ou em contexto de falência multissistémica, tal como se ilustra na figura 27.

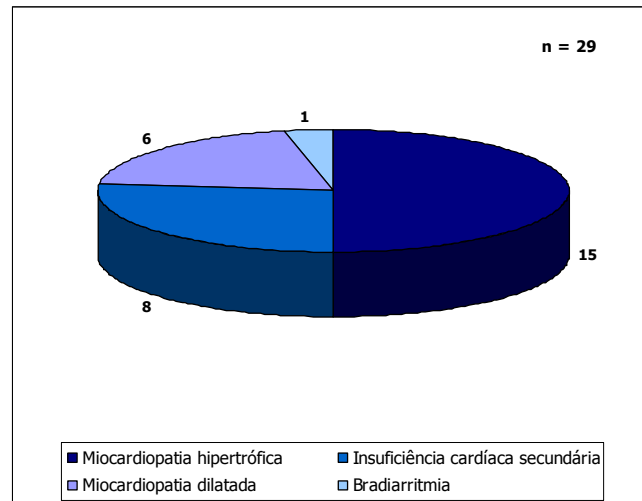


Figura 27 - Evolução cardíaca observada em 29 doentes.

Como documentado na figura 28, houve compromisso hepático em 31 doentes, com destaque para a citólise e o défice de síntese (em 24 e 12 crianças, respectivamente). Cerca de um terço dos casos (11 crianças) com envolvimento hepático cursaram com colestase. Em um havia hepatomegália, com esteatose confirmada por histologia, sem alteração da função hepática.

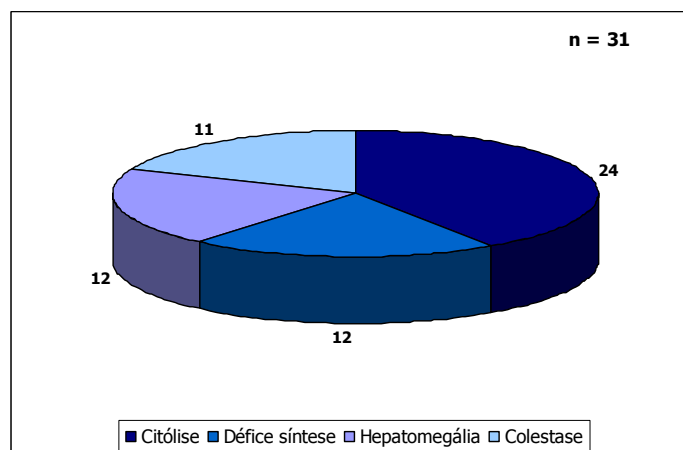


Figura 28 - Evolução hepática observada em 31 doentes.

Em 19 doentes foram registadas transtornos hematológicos fora do contexto de sepsis e/ou insuficiência hepática. A anemia ferripriva, reversível, foi a mais frequentemente observada (11 doentes). Houve pancitopenia persistente em três crianças, alteração do número de plaquetas em três, neutropenia isolada em uma e alteração da coagulação noutra.

Em 16 crianças foi documentada surdez. Tratava-se de surdez neurosensorial em 11 casos (76%), sindromática em todos.

Os vômitos repetidos e/ou prolongados, frequentemente associados a prostração e outras alterações neurológicas crónicas/ permanentes foram os sintomas digestivos mais comuns (oito casos dos 13 com manifestações digestivas). Em quatro crianças houve pseudo-occlusão intestinal e numa, diarreia crónica.

Manifestações renais foram constatadas em 12 crianças. Oito doentes evoluíram com tubulopatia proximal e quatro com insuficiência renal aguda. Destaca-se um caso de insuficiência renal crónica que motivou transplante renal.

O atingimento endócrino foi registado em oito casos (atraso pubertário/ hipogonadismo em quatro casos, hipotireoidismo em três casos; hiperinsulinismo neonatal transitório num caso) e o cutâneo, em sete (hirsutismo em cinco casos, acrocianose em cinco casos e outros em três casos).

Cento e noventa e sete crianças foram seguidas até ao fim do período de estudo. A mortalidade e a morbilidade neste grupo de doentes estão assinaladas na figura 29.

Na tabela 11 resume-se o tempo de evolução e a mortalidade nos 197 doentes cuja evolução até ao fim do período de estudo se conhece. Os sobreviventes (144) tinham então entre um e 33 anos de idade, com média e mediana de 12 anos.

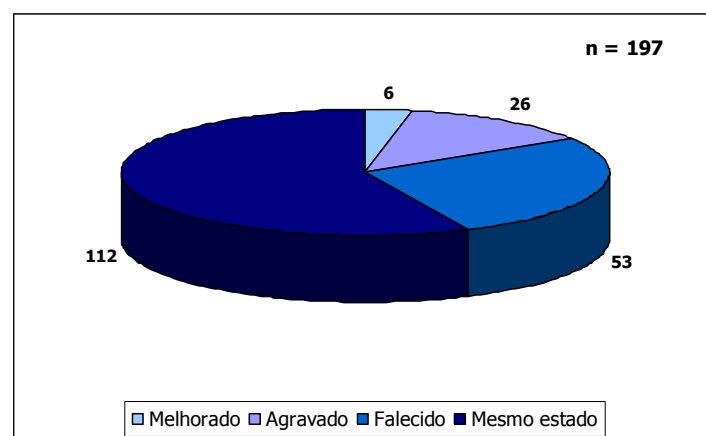


Figura 29 - Evolução da morbilidade e mortalidade em 197 doentes.

Tabela 11 - Mortalidade e tempo de evolução em 197 doentes.

Tempo de evolução (*)	nº	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	SD
Falecidos	53	0**	15,3	0,8	2,8	3,5
Sobreviventes	144	1,2	31,9	9,5	10,4	5,7

* em anos; **primeiro dia de vida

Cinquenta e três crianças (27%) faleceram entre o primeiro dia de vida e os 21 anos de idade (média de 2,8 anos; mediana de 0,8 anos - 9 meses). Quase todas faleceram na primeira década de vida, 17% no período neonatal e 83% antes dos 5 anos de idade, como se pode ver na tabela 12.

Tabela 12 - Mortalidade em 53 doentes - idade do óbito.

Idade óbito	nº	%	% cumulativa
7d[3	6	6
[7 - 30d[6	11	17
[1 - 6M[13	25	42
[6 - 12M[8	15	57
[1 - 2A[7	13	70
[2 - 5A[7	13	83
[5 - 10A[4	8	91
[10A	5	9	100
Total	53	100	100

Nas tabelas 13 e 14 correlaciona-se o tipo de apresentação clínica (ENM ou NM) com tipo de doente (agudo ou crónico) e a evolução.

Tabela 13 - Clínica na apresentação e tipo de doente - agudo ou crónico.

Tipo doente*	ENM		NM		Total
	nº	%	nº	%	
Crónico	22	47	126	82	148
Agudo	25	53	27	18	52
Total	47	100	153	100	200

Abreviaturas: ENM- extra-neurológica e/ou muscular; NM- neurológico e/ou muscular.

*Tipo de doente no diagnóstico: doente crónico - sem agudização; doente agudo - episódio agudo, fatal ou altamente incapacitante em criança previamente saudável ou com doença crónica.

Tabela 14 - Circunstâncias clínicas no diagnóstico.

Tipo doente	Crónico		Agudo	Total
	Crónica	Aguda fatal/ grave		
Sobrevivência	145	1	1	147
Óbito > 6M evolução*	3	19	0	22
Óbito < 6M evolução*	0	0	31	31
Total	148	20	32	200

Relação entre o tipo de doente, clínica no diagnóstico e prognóstico vital.

* evolução da doença.

5.1.2 Caracterização laboratorial da amostra

Em todos os casos a investigação etiológica incluiu o estudo de outros tecidos além do sangue periférico. As biópsias foram programadas em sessões operatórias próprias em 154 crianças (77%) e realizadas juntamente com outras cirurgias (*oportunistas*) em 21 (10,5%), tal como representado na figura 30. As colheitas de tecidos foram realizadas logo após a morte em 25 doentes (12,5% dos casos), quatro dos quais tinham sido submetidos a biópsia prévia.

A figura 31 ilustra a distribuição dos tecidos investigados nos 200 doentes. Em cada caso foi investigado um ou mais tecidos. Em 193 doentes (96,5%) foi estudado o músculo esquelético, em 41 (20,5%), o fígado e o miocárdio, em 11 (5,5%). O miocárdio foi investigado simultaneamente com o fígado e o músculo, em colheita *post mortem* imediata, em todos os 11 casos. Em sete crianças, o fígado foi o único tecido investigado.

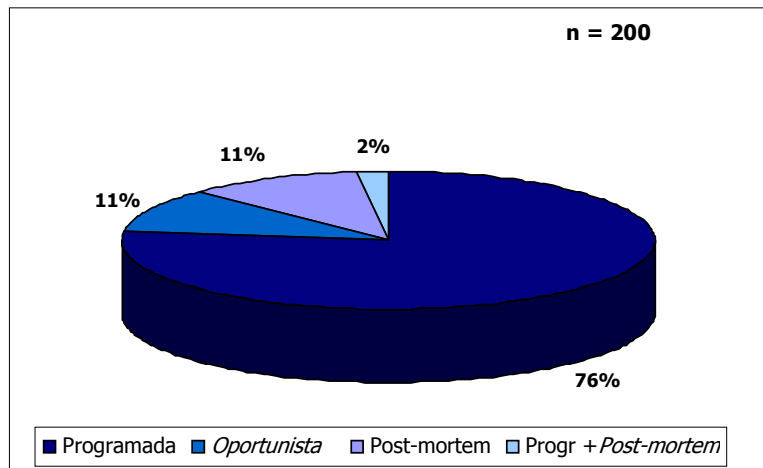


Figura 30 - Tipo de colheita de tecidos realizada em 200 doentes.

Abreviaturas: Programada- em sessão operatória própria; *Oportunista* – juntamente com outra cirurgia; Progr + *Post mortem* – duas colheitas: em sessão operatória própria e *post mortem*.

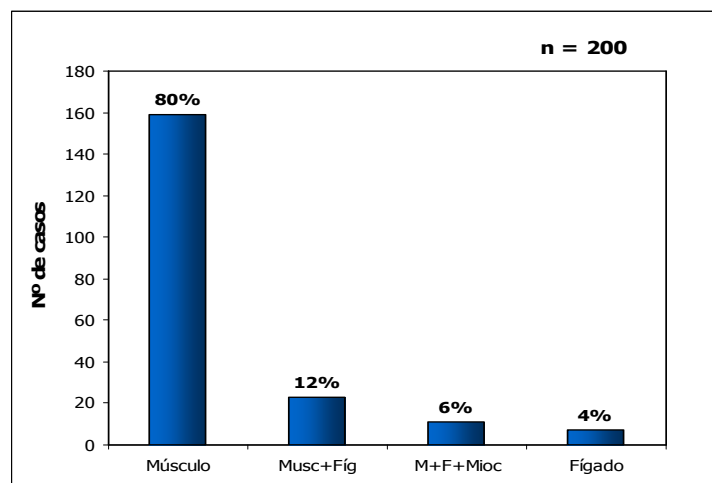


Figura 31 - Tecidos estudados por doente.

Abreviaturas: Musc+ Fíg – músculo e fígado; Musc+F+ Mioc – músculo, fígado e miocárdio.

Exames complementares de diagnóstico - A investigação etiológica em cada doente foi orientada pela clínica. Referem-se de seguida os exames complementares mais relevantes realizados para avaliação funcional multiorgânica e diagnóstico diferencial.

Os resultados dos estudos do lactato e piruvato, dos aminoácidos, dos ácidos orgânicos e histológicos, usados simultaneamente para diagnóstico diferencial e mitocondrial, serão tratados no capítulo da investigação da cadeia respiratória mitocondrial.

Em 19 crianças foi investigada a possibilidade de síndrome de maldigestão e de déficit de absorção, tendo cada uma destas situações patológicas sido confirmada em um caso. O teste do suor, realizado em oito crianças e os níveis de ácido fólico e vitamina B12, quantificados em 11, mostraram sempre valores normais.

A presença de açúcares redutores na urina, pesquisada em 18 crianças, foi detectada em quatro, duas das quais no contexto de insuficiência hepática fatal. No terceiro, o açúcar em causa foi a lactose, o que, no contexto clínico de doença hepática de causa desconhecida, levou ao estudo dos polióis urinários, que se revelaram normais.

Na figura 32 destacam-se os exames complementares mais usados para diagnóstico diferencial.

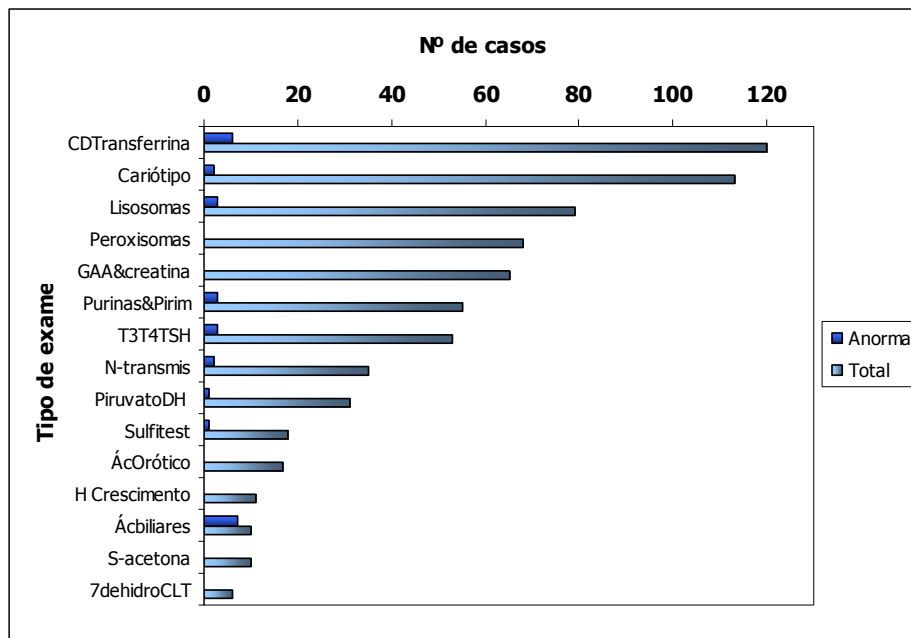


Figura 32 - Exames complementares realizados para diagnóstico diferencial.

Abreviaturas: CDTransferrina- transferrina sérica deficiente em carboidratos; GAA e creatina- ácido guanidoacético e creatina urinários; N-transm- neurotransmissores (aminas biogénicas) *líquor* e urina; PiruvatoDH - piruvato-desidrogenase; ÁcOrótico – ácido orótico urinário; H Crescimento- hormona do crescimento; S-acetona- succinilacetona; Ácbiliares- ácidos biliares plasmáticos e urinários; 7dehidroCLT – 7-dehidro-colesterol.

De entre os estudos hormonais, realizados em 61 doentes, destacam-se os da função tiroideia (53 doentes), três dos quais alterados (hipotireoidismo: dois hipofisários) e os da hormona de crescimento (11 doentes), todos normais.

O doseamento da piruvato-desidrogenase e o da biotinidase foram realizados em 31 e em 10 casos, respectivamente. O primeiro foi feito em linfócitos (26 doentes), músculo (três doentes) e /ou fibroblastos (cinco doentes) e o segundo em sangue colhido em cartão. A determinação de ambas as enzimas foi feita em quatro doentes. Identificou-se

um caso de déficit de piruvato-desidrogenase (numa criança com síndrome de Leigh) e nenhum déficit de biotinidase.

Em três crianças foi diagnosticada doença lisossômica: duas com déficit de α -1-glucosidase (doença de Pompe) que tinham alterações musculares histológicas orientadoras e uma com leucodistrofia metacromática (déficit de arilsulfatase A), em que a RMN cerebral mostrava lesões compatíveis com aquele diagnóstico. Em nenhum dos 76 casos em que o estudo foi orientado por sinais inespecíficos foi confirmada doença lisossômica.

Nos seis doentes nos quais foi identificada elevação da percentagem de transferrina hipoglicosilada, a focagem isoeléctrica da transferrina identificou quatro casos com um perfil de insuficiência hepática, um déficit de glicosilação das proteínas do tipo I e um do tipo X.

Em doentes seleccionados (22), foram feitos outros estudos enzimáticos na procura de um diagnóstico etiológico que não se confirmou, nomeadamente a galactose-1-fosfato uridil-transferase (em seis casos), enzimas envolvidas no metabolismo do glicogénio (em seis casos), na β -oxidação dos ácidos gordos (em três casos) e no metabolismo dos neurotransmissores, respectivamente da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos e da dihidrobiopterina reductase - DHPR- (em dois casos cada).

Estudos bioquímicos para rastreio de doença de Wilson (cobre urinário e ceruloplasmina plasmática) foram realizados em sete casos, com resultados normais em todos.

O cariótipo em leucócitos do sangue periférico e/ou em fibroblastos da pele foi normal em 113 crianças. Em 14 destes casos, foi ainda realizado estudo por FISH (Hibridização In Situ por Fluorescência) das regiões subteloéricas, tendo-se identificado três rearranjos subteloéricos crípticos: 46,XX,ishder(22)t(7;22) (q36;q13.3) (G31340+,D22S1726-), correspondendo a uma monossomia parcial da região telomérica do braço longo do cromossoma 22 associada a uma trissomia parcial da região telomérica do braço longo do cromossoma 7; 46,XY,add(9)(q34.3).ishdup(9) (q34.11?qter9) (wcp9+.D9S2168+)dn, correspondendo a uma trissomia parcial da região distal do braço longo do cromossoma 9 por duplicação *de novo*; e 46,XX,ishdel(1) (p36.3) (CEB108-), ou seja, uma monossomia da região telomérica do braço curto do cromossoma 1. Foram pesquisadas pela técnica de FISH e não detectadas, as microdelecções cromossómicas associadas às síndromes velocardiocfacial (22q11.2) e lisencefalia de Miller-Dicker (17p13), em duas e uma criança, respectivamente. Em 16 crianças investigadas para Síndrome de Angelman, diagnosticou-se um caso de deleção materna da região crítica detectada por estudos de metilação e citogenéticos [46,XY.ish del(15) (q11.2q11.2) (SNRPN-,UBE3A-)].

Não se identificou nenhum caso de Síndrome do X-frágil nos 33 investigados. Não foram detectadas mutações patogénicas nas crianças nas quais foi feito o estudo molecular da distrofia miotónica, da atrofia muscular espinhal ou da Síndrome de Rett.

Nos outros estudos moleculares realizados incluem-se as mutações mais comuns do défice da desidrogenase dos hidroxi-ácidos gordos de cadeia longa e da dos ácidos gordos de cadeia média (LCHAD, MCAD) e das glicogenoses Ia e Ib, entre outras, tal como ilustrado na figura 33.

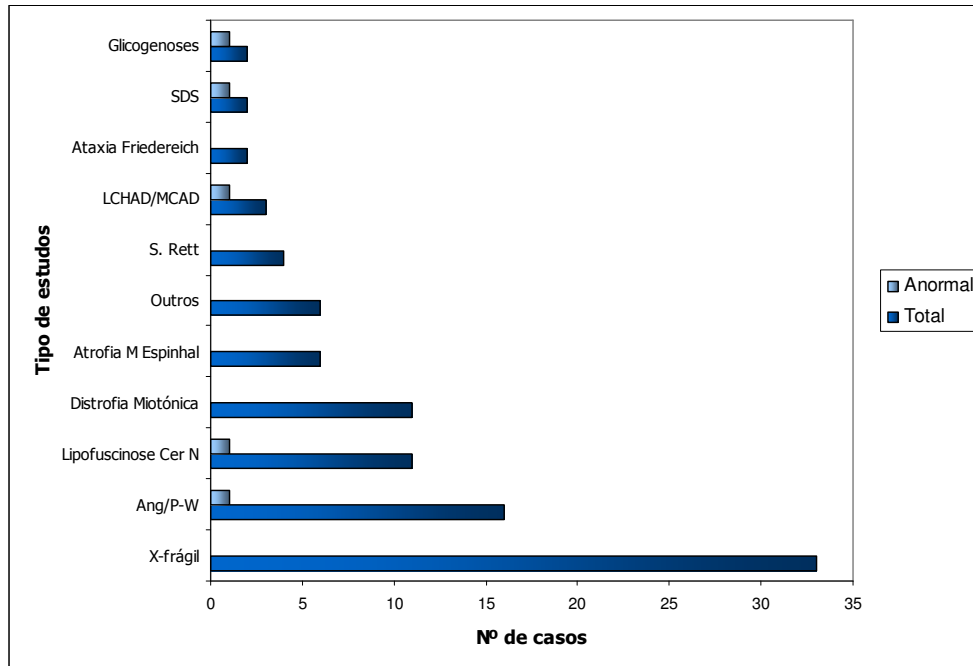


Figura 33 - Exames complementares para diagnóstico diferencial - estudos moleculares.

Abreviaturas: Ang/P-W – Angelman / Prader –Willi; Lipofuscinoses Cer N- lipofuscinoses ceróide neuronal; LCHAD/ MCAD – desidrogenases dos hidroxi-ácidos gordos de cadeia longa e dos ácidos gordos de cadeia média; SDS- síndrome de Shwachman-Diamond.

Seis crianças foram submetidas a colheita de medula óssea, que se revelou normal em cinco. A sexta, na qual se veio a diagnosticar Síndrome de Pearson, mostrou aplasia de todas as linhas celulares e sideroblastos em anel. O rastreio de alterações da imunidade celular e humoral, levado a cabo em 44 casos, foi normal em todos.

Os estudos microbiológicos, realizados de acordo com a clínica, foram negativos na sua maioria. Como resumido na tabela 15, em oito casos uma infecção viral terá estado na origem do (ou pelo menos associada ao) episódio agudo, que constituiu doença inaugural em sete. Em dois deles não se identificou o presumível vírus, mas a necropsia demonstrou a existência de meningoencefalite num e pericardite com miocardite focal no outro. Num outro caso foi demonstrada no período pós-natal uma infecção por citomegalovírus, mas as manifestações clínicas tiveram início antes do nascimento e a pesquisa de citomegalovírus por PCR no sangue do cartão do diagnóstico precoce foi negativa.

Tabela 15 - Suspeita de DRCM e infecção por vírus.

Clínica	Vírus	Serol.	PCR	Comentário	Evolução
Encefalite; suspeita de ADEM ¹	InfluenzaA	Neg	nr	Imunofluorescência + secreções respiratórias	Falência multiorgânica Estado vegetativo
Fígado granuloso pré-natal	CMV	Pos	Neg ^(a)	^(a) CartãoDP	Atraso crescimento Hiperlactacidemia
Insuficiência hepática aguda	Herpes + EBV	Neg ^(b)	Pos	^(b) uma determinação	Fatal ²
Doença celíaca + Endo/miocardite ^(c)	Não identif	Neg		^(c) necrópsia	Fatal ²
Meningoencefalite ^(d)	Não identif	Neg		^(d) necrópsia	Fatal ²
Miocardiopatia dilatada/ miocardite	EBV	Pos ^(e)	Pos	^(e) uma determinação	Fatal ²
Falência hepática fulminante	Adenovírus	Pos ^(f)	nr	^(f) uma determinação	Fatal ²
Encefalite; suspeita de ADEM ¹	Adenovírus	Pos ^(g)	Pos/ Neg	^(g) duas determinações	Estado vegetativo
Miocardiopatia dilatada	Rubéola	Pos ^(h)	nr	^(h) duas determinações	Miopatia
Insuficiência hepática aguda	Parvovírus	Pos ⁽ⁱ⁾	Neg	⁽ⁱ⁾ uma determinação	Fatal ²

Abreviaturas: Serol. – diagnóstico serológico; Neg- negativo; Pos- positivo; CartãoDP- em sangue do cartão do diagnóstico precoce; nr- não realizado; Não identif- não identificado. CMV- citomegalovírus EBV- vírus Epstein-Barr; ¹ADEM (*Acute Disseminated EncephaloMyelitis*) – encefalomielite aguda disseminada. ²Fatal no episódio agudo.

Foi realizado pelo menos um exame de imagem cerebral (ecografia, TAC e/ou RMN) em 179 dos 200 doentes estudados. Em 125 (70%) havia alterações, como discriminado na tabela 16 para cada um dos referidos exames.

Tabela 16 - Exames de imagem cerebral realizados em 179 doentes.

n=200	Ecografia	TAC	RMN	Total
Anormal	8 (14%)	46 (69%)	112 (75%)	125 (70%)
Total	56	67	149	179

TAC - tomografia axial computadorizada; RMN ressonância magnética nuclear.

Em 14 doentes, a ecografia foi o único método de imagem cerebral usado, tendo sido anormal em dois. Nos outros seis casos em que a ecografia cerebral mostrou alterações, estas também se verificaram na TAC e/ou RMN. Em 43 dos 165 doentes que realizaram RMN e/ou TAC cerebral não foram detectadas alterações.

A atrofia do SNC, presente em 94 doentes, foi a única alteração encontrada em 41 casos. A sua distribuição está resumida na tabela 17. O caso ilustrado na figura 34 associou leucoencefalopatia e atrofia severa.

Tabela 17 - Distribuição da atrofia do SNC em 94 doentes.

Atrofia	Total=94	%
Cortical	73	78
Subcortical	40	43
Corpo Caloso	32	34
Cerebelo	19	20
Generalizada	8	9
Tronco	7	7

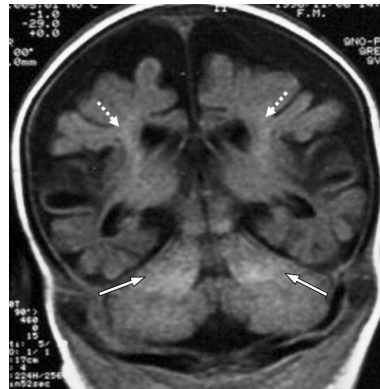


Figura 34 - Atrofia corticossubcortical marcada e leucoencefalopatia num doente.

Imagem de RMN em corte coronal ponderado em FLAIR aos 2 meses de idade em criança com acidose láctica, falecida no primeiro ano de vida. As setas assinalam lesões de leucoencefalopatia, periventricular (a tracejado) e dos pedúnculos cerebelosos inferiores (lineares).

Em 81 doentes outro tipo de lesões (associadas ou não a atrofia) estava presente, sendo simétricas em 14. A sua distribuição está resumida na tabela 18.

Tabela 18 - Distribuição das alterações detectadas na RMN e/ou TAC cerebral em 81 doentes.

RMN e/ou TAC cerebral	N=165	%
Substância branca supratentorial	35	21
Núcleos da base	24	15
Tálamo	11	7
Protuberância	9	5
Bolbo	9	5
Substância cinzenta periaquedutal	8	5
Pedúnculos	8	5
Substância nigra	5	3
Substância branca infratentorial	5	3
Núcleos subtalâmicos	3	2
Núcleos vermelhos	2	1
Núcleos cerebelosos	2	1

Abreviaturas: TAC - tomografia axial computadorizada; RMN ressonância magnética nuclear.

Na figura 35 mostra-se imagens de RMN cerebral de uma criança com síndrome de Leigh.

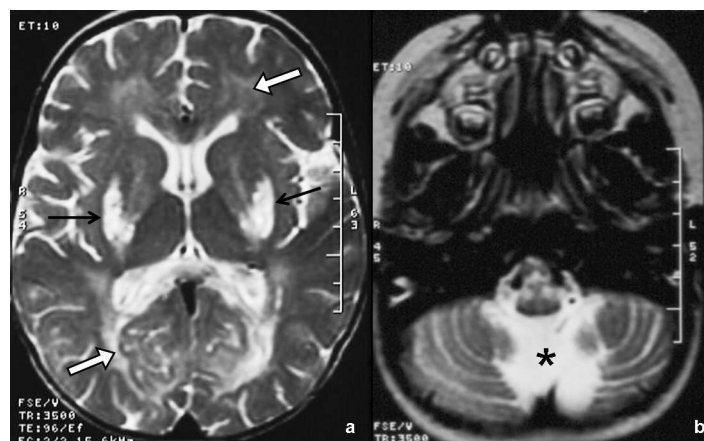


Figura 35 - Imagens de RMN numa criança de dois anos com síndrome de Leigh.

Cortes axiais ponderados em T2 (TR/TE 3600/96): (a)- lesões hiperintensas, simétricas envolvendo os núcleos lenticulares (setas estreitas) e a substância branca periventricular (setas largas); (b)- atrofia cerebelosa vermiana (asterisco).

O estudo histológico do músculo, fígado e/ou miocárdio foi realizado em 191 doentes (figura 36). Em 30 casos foram estudados simultaneamente o músculo e o fígado e em cinco, os três tecidos.

A biópsia muscular foi realizada no músculo deltóide esquerdo em 89% dos casos. Em 90 doentes foi feito estudo de músculo em microscopia electrónica.

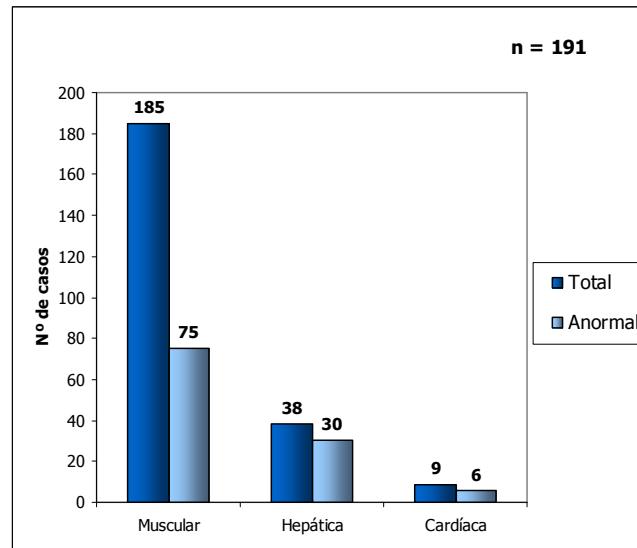


Figura 36 - Resultados do estudo histológico realizado em 191 doentes.

O estudo em microscopia óptica do músculo esquelético mostrou alterações em 75 dos 185 doentes em que foi realizado, como se ilustra na figura 37.

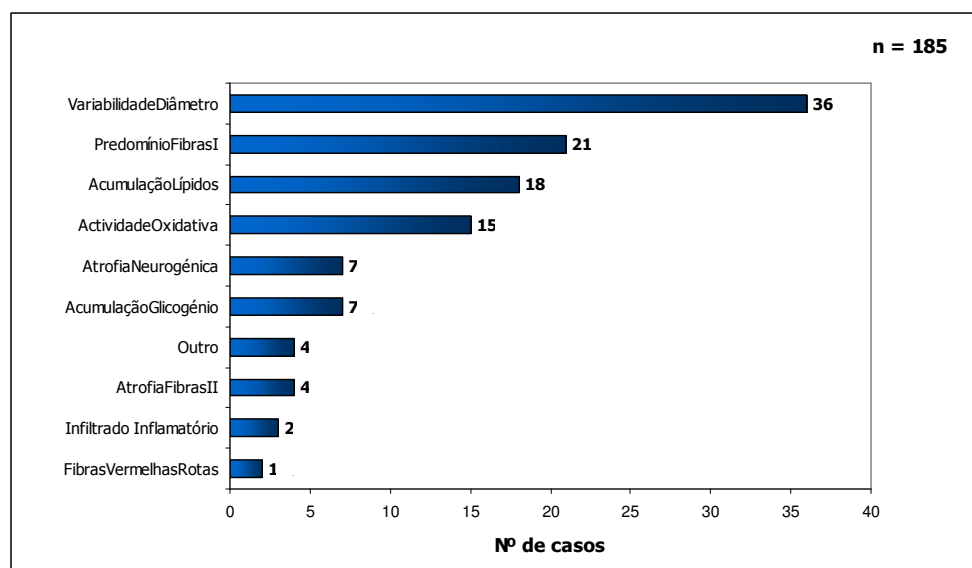


Figura 37 - Resultados do estudo histológico do músculo em microscopia óptica em 185 doentes.

A figura 38 ilustra as alterações histológicas do músculo mais informativas no contexto de suspeita de DCRM em doentes da nossa série.

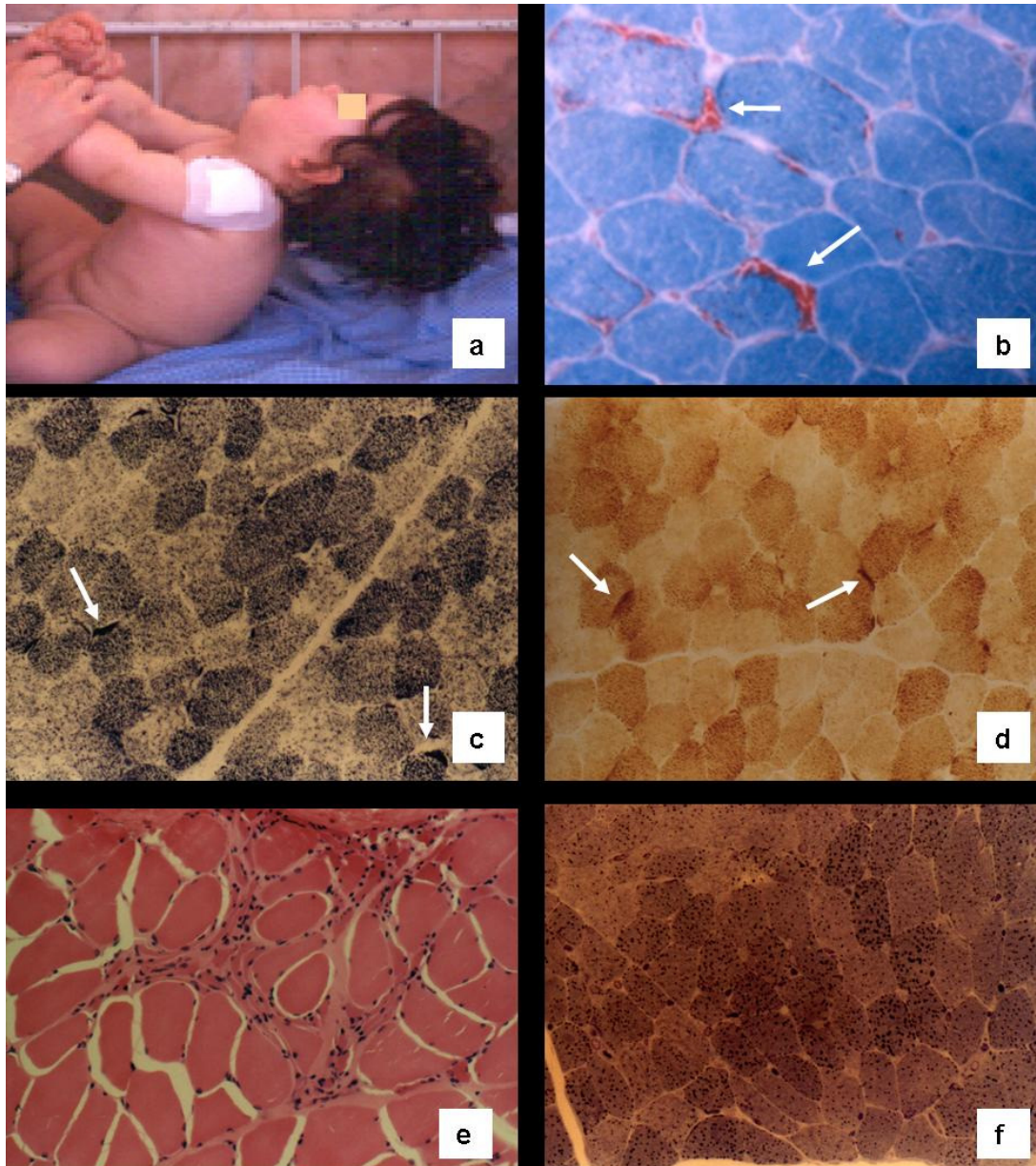


Figura 38 - Imagens do estudo histológico do músculo.

(a) a biópsia foi habitualmente realizada na região deltóide; (b) fibras vermelhas rotas (*RRF*) evidenciadas com o tricrómio de Gomori (setas); (c) e (d) coloração histoenzimológica com a succinato desidrogenase (SDH) e a citocromo oxidase (COX), respectivamente, demonstrando aumento da actividade oxidativa sob a forma de crescentes subsarcolémicos por acumulação de mitocôndrias (setas); (e) coloração pela hematoxilina-eosina mostra atrofia muscular neurogénica neste caso; (f) acumulação de lípidos revelada pelo azul de toluidina.

Cada doente apresentou uma ou mais das seguintes alterações: aumento da normal variação de diâmetro das fibras (36 casos), predomínio de fibras tipo I (21 casos),

aumento da actividade oxidativa subsarcolémica (15 casos, cinco dos quais com formação de crescentes), acumulação de lípidos (18 casos), atrofia neurogénica (sete casos), acumulação de glicogénio (sete casos), atrofia de fibras tipo II (quatro casos), miopatia inflamatória (três casos), fibras vermelhas rotas - *RRF* (dois casos) e outras anomalias (quatro casos).

Em 13 das 90 crianças cuja amostra de músculo foi analisada em microscopia electrónica havia uma ou mais das seguintes anomalias: modificação da estrutura mitocondrial (em sete doentes) sobrecarga de glicogénio intra/ extra lisossómico (em quatro doentes), acumulação de lípidos (em dois doentes) e alterações compatíveis com conectivite (num doente). As alterações mitocondriais consistiram em: pobreza de cristas, com vacuolização (em quatro casos), mitocôndrias com alteração da estrutura das cristas (em dois casos) e mitocôndrias em aglomerados, com matriz granulosa, cristas concêntricas e inclusões paracristalinas (num caso).

Foram encontradas alterações em 30 dos 38 doentes em que foi feita microscopia óptica do tecido hepático (figura 39). A esteatose foi a alteração mais frequente, sendo macrovacuolar em quatro doentes, microvacuolar em dois e mista em sete. No único caso estudado em microscopia electrónica não foram encontradas anomalias.

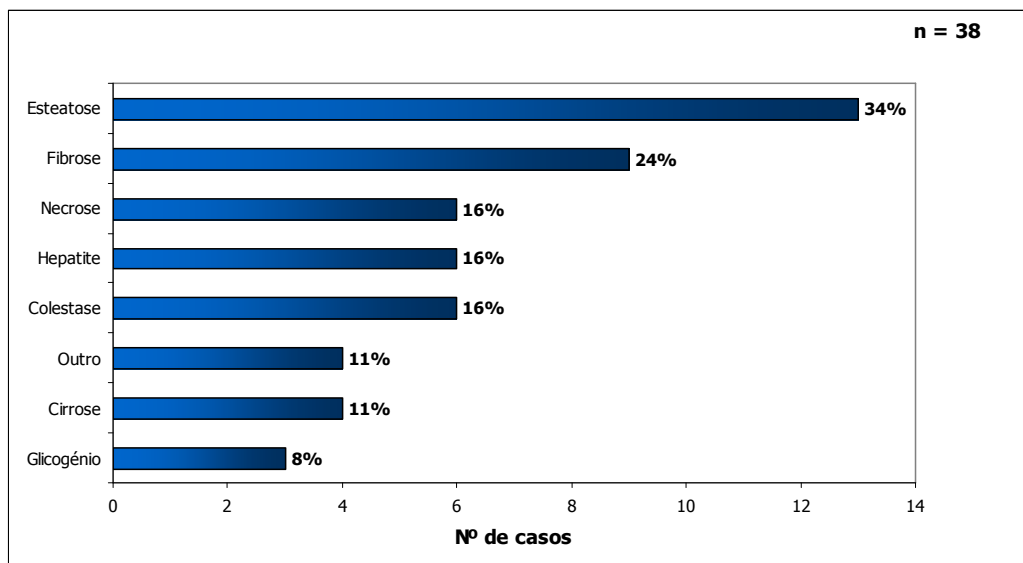


Figura 39 - Resultados do estudo histológico do fígado em microscopia óptica em 38 doentes.

Havia alterações cardíacas em seis dos nove casos estudados *post mortem*: vacuolização citoplásmica (em três casos), miocardite com ou sem pericardite e vasculite (em dois casos) e vesículas lipídicas (num caso).

Muitos outros exames, como os ecográficos e os electrofisiológicos, realizados de acordo com a clínica, no âmbito do rastreio de envolvimento multiorgânico e do

diagnóstico diferencial, permitiram diagnósticos sindrômicos como miocardiopatia, neuropatia periférica ou retinopatia, entre outros.

Investigação da cadeia respiratória mitocondrial

Os níveis de lactato plasmático foram determinados pelo menos uma vez em 197 doentes (98,5%). Encontrou-se hiperlactacidémia em uma ou mais ocasiões em 148 casos (75%). Os doentes foram classificados em cinco classes de gravidade, como ilustrado na figura 40. Em 29 doentes a lactacidémia, realizada em três ou mais ocasiões, era normal em todas as determinações. Em 20 doentes, a lactacidémia, realizada em uma ou duas ocasiões, era normal. Em 58 casos a hiperlactacidémia foi detectada em apenas uma ou duas ocasiões, sem acidose. Em 73 casos verificou-se hiperlactacidémia sem acidose, em pelo menos três determinações. Dezassete doentes tiveram acidose láctica.

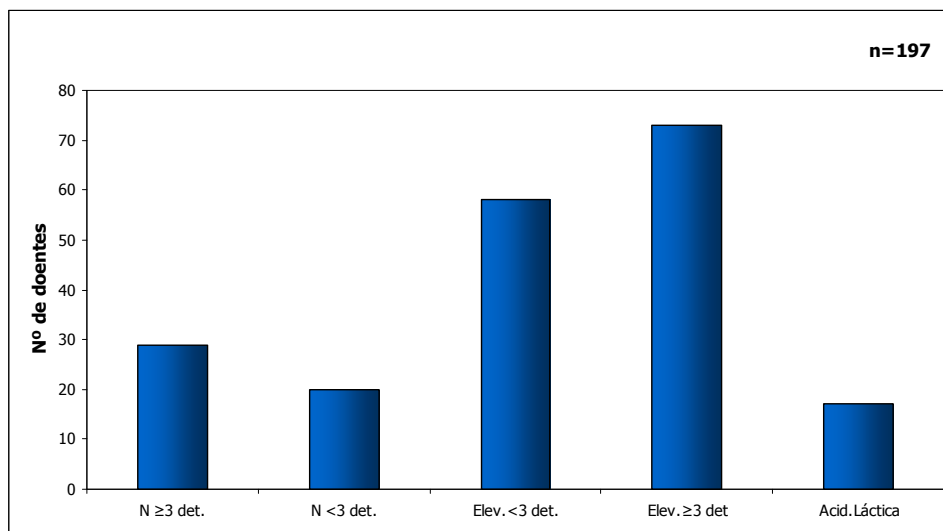


Figura 40 - Lactacidémia em 197 doentes classificados em cinco classes de gravidade.

Abreviaturas: N ≥3 det. – lactacidémia normal em três ou mais determinações; N <3 det. – lactacidémia normal em menos de três determinações; Elev.<3 det. – lactacidémia elevada em menos de três determinações, sem acidose; Elev.≥3 det. – lactacidémia elevada em três ou mais determinações, sem acidose; Acid.Láctica – acidose láctica.

Em 154 doentes foi feita a determinação do piruvato plasmático, sendo estabelecida a relação lactato/ piruvato. Nas 89 crianças com hiperlactacidémia, aquela relação foi superior a 20 em 73 (82%) casos.

O lactato do *líquor*, doseado em 93 doentes (47% da amostra total) estava elevado em 26 (28%). Em dois destes, a lactacidémia foi normal. Em 47 dos 93 doentes (50%) houve concordância entre os valores do lactato no líquido cefalorraquídeo e no plasma, sendo 24 elevados e 20 normais em ambos os exames determinados simultaneamente,

como reportado na tabela 19. A lactatorraquia estava elevada em cinco de seis dos 17 doentes com acidose láctica nos quais foi doseada, sendo que em um era normal.

Tabela 19 - Relação entre os valores do lactato plasma e no *líquor* em 93 doentes.

n=93 Lactato plasma	Lactato <i>líquor</i>	
	Normal	Elevado
Normal	20	2
Elevado	47	24

A razão lactato /piruvato era superior a 20 em 17 dos 26 casos com lactato elevado no *líquor*. Nos 21 doentes com lactato elevado no plasma e no *líquor* e em quem foi determinado o piruvato, verificou-se concordância relativamente ao quociente lactato/piruvato no plasma e no *líquor* em 17 casos (81%), estando aumentado em 13 e normal em quatro casos.

Em 34 crianças foi feita RMS. Em todas foi determinada a lactacidémia e em metade, o lactato no líquido cefalorraquídeo. Foram identificados picos de lactato na espectroscopia em nove doentes (26%), como se ilustra na figura 41.

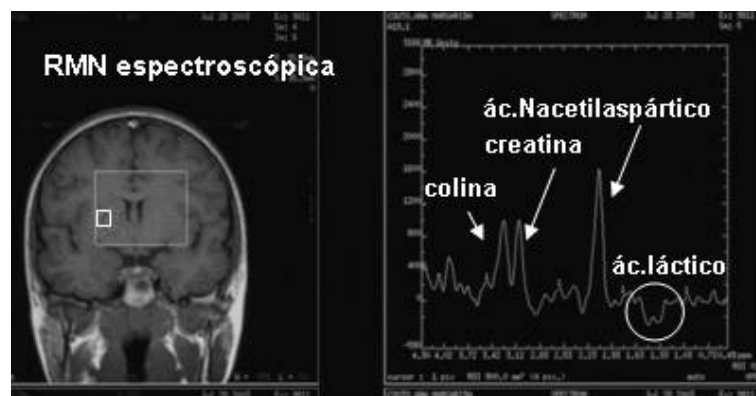


Figura 41 - ¹H RMS num doente mostrando picos anormais de lactato

Dos nove casos com espectroscopia positiva, em apenas um não foi demonstrada hiperlactacidémia (tabela 20).

Tabela 20 - Relação entre a lactacidémia e os resultados da RMS em 34 doentes.

n=34 RMS	Lactato plasma	
	N	>N
Lactato N	3	22

Lactato>N	1	8
---------------------	---	---

RMS - ressonância magnética espectroscópica.

Em 12 dos 17 casos em que foi feita espectroscopia e determinação da lactatorraquia, os valores foram congruentes (10 casos e 2 casos com lactato normal e elevado, respectivamente), como referido na tabela 21.

Tabela 21 - Relação entre o lactato no *líquor* e os resultados da RMS em 17 doentes.

n=17	Lactato <i>líquor</i>	
	N	>N
RMS		
Lactato N	10	3
Lactato>N	2	2

Abreviaturas: LCR – *líquor*; RMS - ressonância magnética espectroscópica.

Os valores de alaninémia foram pelo menos uma vez superiores ao normal (410 μ M) em 42 doentes e superiores a 450 μ M em 36 dos 172 doentes em quem foi determinada. Nos 42 casos de hiperalaninémia, o lactato plasmático estava elevado em todos, excepto em dois (tabela 22).

Tabela 22 - Relação entre a alaninémia e a lactacidémia em 39 doentes.

Lactacidémia	Alaninémia		Total
	Normal	Elevada	
Normal	37	2	39
Elevada	94	40	134
Total	131	42	173

A prolinémia foi quantificada em 173 crianças, sendo superior ao normal em 13. Destas, todas tiveram hiperlactacidémia e hiperalaninémia, excepto uma (tabelas 23 e 24).

Tabela 23 - Relação entre prolinémia e a lactacidémia em 173 doentes.

Prolinémia	Lactacidémia		Total
	Normal	Elevada	
Normal	38	122	160

Elevada	1	12	13
Total	39	134	173

Tabela 24 - Relação entre a prolinémia e a alaninémia em 173 doentes.

Prolinémia	Alaninémia		Total
	Normal	Elevada	
Normal	130	30	160
Elevada	1	12	13
Total	131	42	173

Na tabela 25 resumem-se os resultados da relação entre os níveis de lactato, alanina e prolina no plasma e a existência de picos de lactato em ¹H RMS nos doentes em quem foram determinados. A concordância de resultados entre a ¹H RMS e a lactacidémia, alaninémia e prolinémia foi de 32%, 91% e 69%, respectivamente.

Tabela 25 - Relação entre lactato, alanina e prolina no plasma e os resultados da RMS.

RMS	Lactacidémia n=34		Alaninémia n=32		Prolinémia n=32	
	Normal	Elevado	Normal	Elevado	Normal	Elevado
Lactato normal	3	22	22	1	21	2
Lactato elevado	1	8	2	7	8	1

Abreviatura: RMS - ressonância magnética espectroscópica.

A figura 42 resume a investigação *redox* realizada nos 200 doentes.

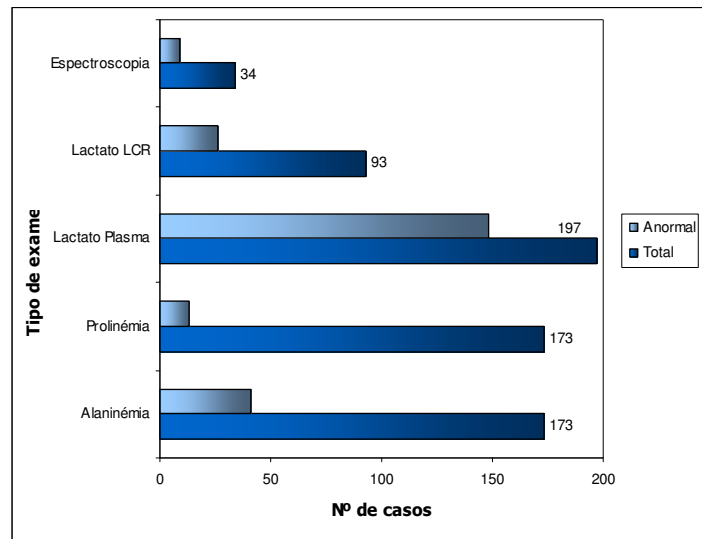


Figura 42 - Estudo *redox* realizado nos 200 doentes em estudo.

A cromatografia de ácidos orgânicos urinários foi feita em pelo menos uma ocasião em 175 crianças (88% dos doentes). Mostrou alterações em uma ou mais determinações em 34 crianças (19%): excreção aumentada de lactato e/ou intermediários do ciclo de Krebs (em 16% dos casos); alterações compatíveis com defeito da β -oxidação dos ácidos gordos (em oito, 5% dos casos), ambos os anteriores (em cinco, 3% dos casos); outras alterações (em seis, 3% dos casos).

A avaliação enzimática dos complexos I-V da CRM por espectrofotometria foi realizada em 198 dos 200 casos do estudo.

Em 191 doentes foi estudado o músculo (mitocôndrias isoladas em 46, homogeneizado em 102 doentes e ambas as preparações em 43 doentes), em 41 doentes, o homogeneizado de fígado e em 11 doentes, o do miocárdio. O músculo foi o único tecido estudado em 157 casos. Em 23 doentes foi analisado o músculo e o fígado e em sete apenas o fígado. Nos 11 doentes em que foi estudado o miocárdio, o músculo e o fígado foram igualmente investigados.

Em 25 casos foram realizadas colheitas nas primeiras três horas *post mortem* para estudo da CRM, independentemente de já ter ou não havido biópsias anteriores. Todas as amostras de miocárdio pertencem àquele grupo.

Foi detectado défice (menos de 30% da média do v.r. corrigido para a citrato sintase) de um ou mais complexos da CRM em pelo menos um tecido em 130 doentes (65,7%). Em 90 casos (46%), o défice era *major*, isto é, inferior a 20% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase (figura 43).

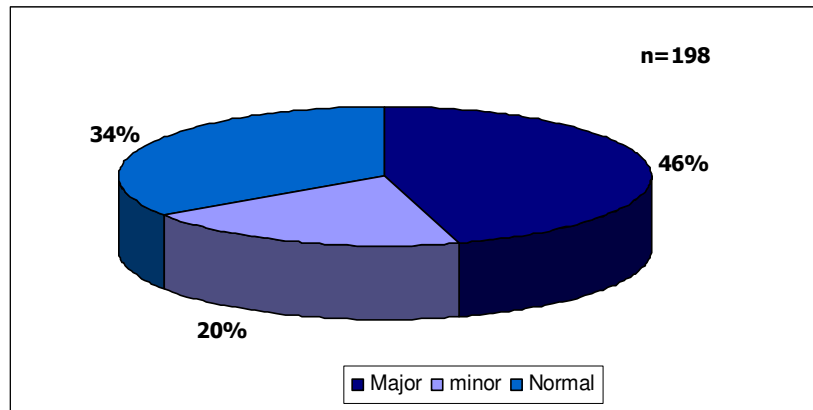


Figura 43 - Avaliação enzimática dos complexos I-V da CRM em 198 doentes.

Foi demonstrado défice de um ou mais complexos da CRM em pelo menos um tecido em 130 casos: *Major* (< 20% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase) em 90 doentes e *minor* (≥ 20 e <30% da média), em 40 crianças.

O complexo IV, isoladamente ou em associação, foi o mais frequentemente afectado (89 doentes), seguido do I (68), do V (42), do III (40) e do II (22), como referido na figura 44.

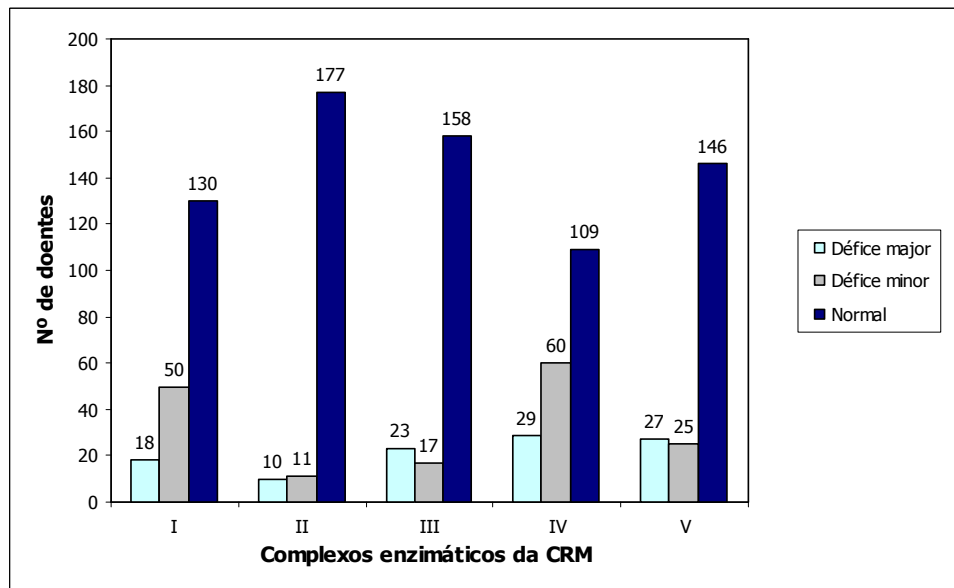


Figura 44 - Actividade dos complexos enzimáticos da CRM em 198 doentes.

Normal: $\geq 30\%$ da média do v.r. normalizado para a citrato sintase; défice *minor*: $\geq 20\%$ a < 30%; défice *major* < 20%.

O complexo II foi o menos afectado (21 doentes). Esteve associado a défice dos complexos IV, I, V e III, em 21, 17, 13 e oito casos, respectivamente. Todos os doentes

com défice do complexo II apresentaram défice generalizado da CRM, isto é, do complexo II e de pelo menos mais dois complexos.

Em 20 casos, o défice foi múltiplo (envolvimento de pelo menos três complexos, à excepção do II), em 35 casos detectou-se deficiência de dois complexos (I+IV em 16 doentes) e nos restantes 55 casos, défice isolado dos complexos: I (14 casos), III (nove casos), IV (25 casos) e V (sete casos), como ilustrado na figura 45.

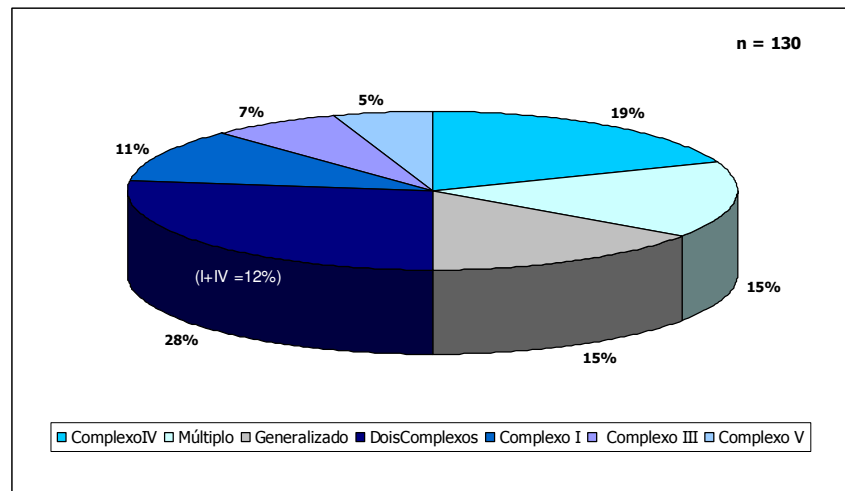


Figura 45 - Défices enzimáticos da CRM em 130 doentes.

Défice enzimático: inferior a 30% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase. Défice de dois complexos em 35 doentes (27%), dos quais I+IV em 16 casos (12%). Défice generalizado - défice do complexo II e de dois ou mais complexos. Défice múltiplo- défice de três ou mais complexos, à excepção do II.

Considerando apenas os casos com valores inferiores a 20% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase (critério *major*) observado em 91 doentes, o défice isolado do complexo IV foi o mais frequente (24% dos casos), seguido do complexo I (23% dos casos) e dos complexos I+IV (13% dos casos). Os défices múltiplos e generalizados representaram 16% e 9%, respectivamente (figura 46). Um dos doentes acima referido como tendo défice major do complexo I apresentou valores do complexo I em músculo e em fígado entre 20 e 30% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase.

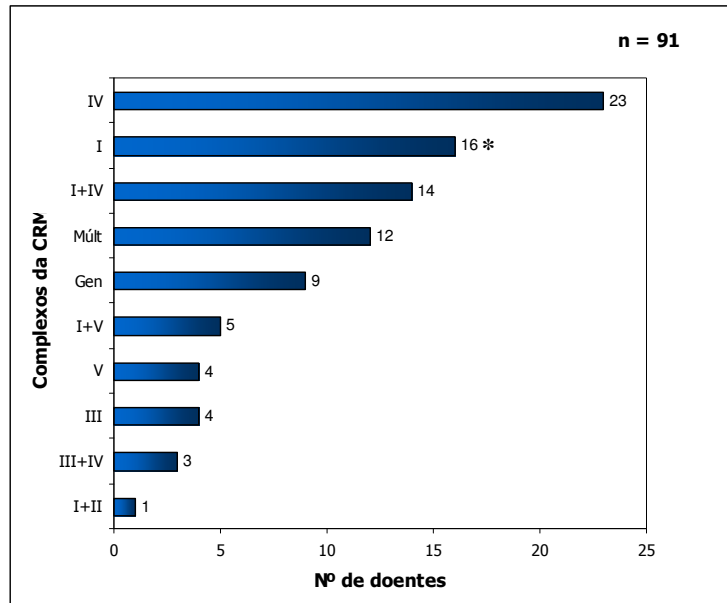


Figura 46 - Défices enzimáticos *major* da CRM em 91 doentes.

Défice enzimático *major*: inferior a 20% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase; Múlt - défice múltiplo: três ou mais complexos, à excepção do complexo II; Gen- défice generalizado: três ou mais complexos, incluindo o complexo II.

*Um caso com valores em músculo e em fígado > 20% e ≤ 30% foi considerado défice *major*.

Quanto à contribuição dos diferentes tecidos para o diagnóstico verificou-se que o músculo mostrou alteração funcional da CRM em 60% dos casos, o fígado em 83% dos casos e o miocárdio em 100% dos casos em que foram investigados, como exposto na figura 47.

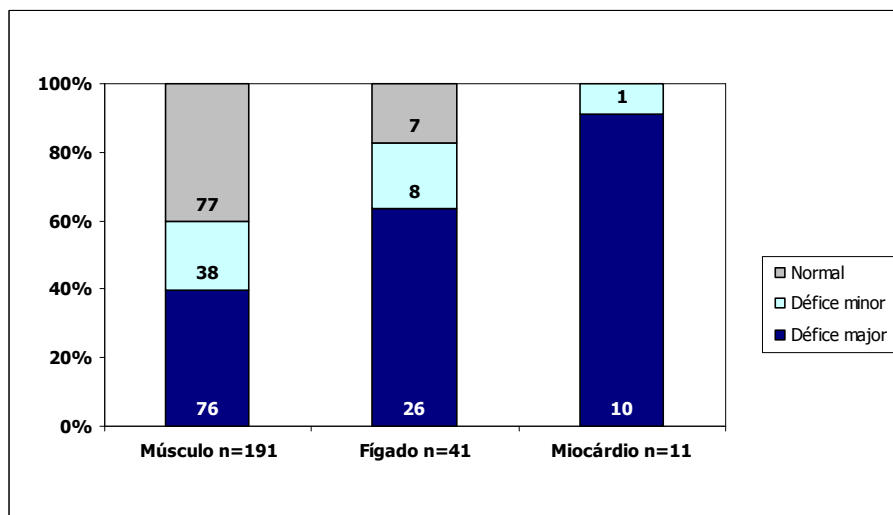


Figura 47 - Actividade da CRM por tecido em 198 doentes.

Normal: ≥ 30% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase; défice *minor*: ≥ 20% a < 30%; défice *major*: <20%.

Análise do DNA mitocondrial e nuclear - Os estudos do mtDNA foram realizados nos vários tecidos (músculo, linfócitos, fígado e/ou miocárdio) ao longo do período de estudo. (ver Anexos, tabelas 40-44, páginas 257- 265)

Na figura 48 representa-se a distribuição do tipo de rastreio (restrito, intermédio e alargado) realizado nos diferentes tecidos dos 200 doentes. O rastreio *alargado* foi feito em linfócitos, músculo, fígado e miocárdio em 8, 30, 11 e 2 doentes, respectivamente e o *intermédio* em 26, 70, 12 e 6 casos. O rastreio foi *restrito* em amostras de linfócitos, músculo, fígado e miocárdio em 77, 92, 14 e 1 doentes, respectivamente.

No global, foi realizado um rastreio *restrito*, *intermédio* e *alargado* em 91, 75 e 34 doentes, respectivamente, em amostra de músculo e/ou fígado.

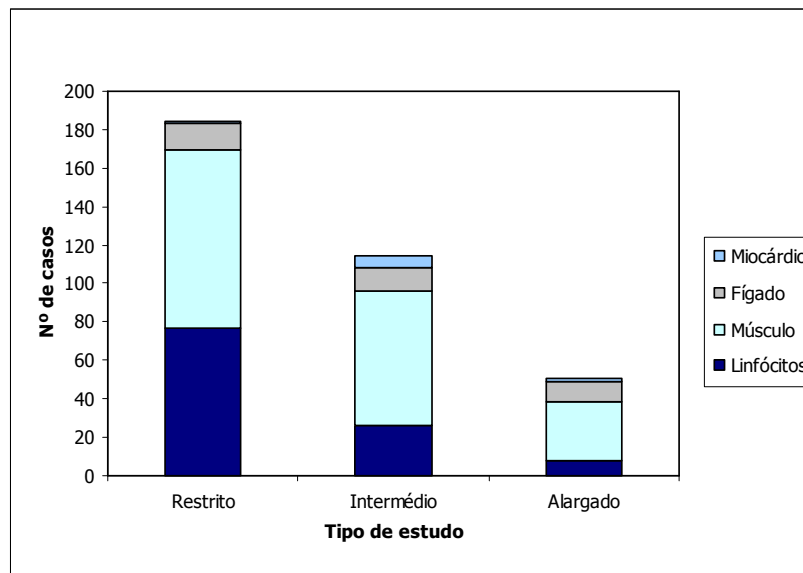


Figura 48 - Rastreio de mutações e deleções do mtDNA em 200 doentes.

Em cinco casos foi possível identificar uma alteração patogénica primária do mtDNA: em dois casos com deleção do mtDNA (um com síndrome de Pearson - deleção de 4404pb e outro com síndrome de Kearns-Sayre - deleção comum - 4977pb), numa criança com síndrome de LHON atípico, com a mutação G11778A, num doente com síndrome de Leigh de hereditariedade materna (T8993G MILS) e numa criança com miopatia mitocondrial com *RRF* e miocardiopatia (A3302G).

Num grupo de nove doentes em quem foram detectadas deleções em músculo, fígado e/ou miocárdio (tratando-se da deleção comum em três casos), está em curso a avaliação do grau de heteroplasmia.

Num terceiro grupo de cinco crianças foram detectadas mutações secundárias de LHON.

Dos sete doentes nos quais foi estudado o gene *SURF1*, encontrou-se alteração em três com síndrome de Leigh, um com uma inserção e outro com uma deleção no gene *SURF1* e num outro doente, entretanto falecido, uma mutação Q8L em heterozigotia no exão 1 do gene *SURF* e dois polimorfismos (T280C e C573G nos exões 4 e 6, respectivamente). Nos dois primeiros doentes tinha sido demonstrado um défice do complexo IV em músculo.

Foi identificado um caso de depleção do mtDNA com duas mutações pontuais (c.353 G>A (p.R118H) no exão 3 e c.749 T>C (p.L250S) no exão 6) do gene da desoxiguanosina cinase (*DGUOK*).

A tabela 26 resume a relação entre a alteração genotípica encontrada e o fenótipo clínico e bioquímico (défice da CRM).

Tabela 26 - Correlação genótipo-fenótipo nos 23 doentes com alteração molecular.

Clínica	I	II	III	IV	V	Músc	Fíg	Mio	DNA
Síndrome de Pearson	-	-	-	-	-	-	-	-	Del 4404pb
Síndrome Kearns-Sayre						nd	nd	nd	Del 4977pb
Insuf.Hep.+Encefalopatia	Mj	mi	-	Mj	Mj	Mj	Mj	-	Depleção (<i>DGUOK</i>)
Miopatia+Miocardiopatia	-	-	-	-	-	-	-	-	Mut A3302G
LHON	-	-	-	-	-	-	-	-	Mut G11778A
Síndrome de Leigh	-	-	Mj	Mj	-	Mj	-	-	Mut T8993G
Síndrome de Leigh	-	-	-	Mj	-	Mj	-	-	<i>SURF1</i>
Síndrome de Leigh	-	-	-	Mj	-	Mj	-	-	<i>SURF1</i>
Síndrome de Leigh	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>SURF1</i> (heterozigótico)
Encefalopatia inespecífica	-	-	-	-	-	-	-	-	Del 6927pb
Encefalopatia inespecífica	-	-	-	-	-	-	-	-	Del 6175pb e 6248pb
Encefalopatia inespecífica						nd	nd	nd	Del 4977pb
Encefalopatia inespecífica	-	-	mi	-	-	mi	-	-	Del 4977pb
Encefalopatia epiléptica	Mj	-	Mj	Mj	mi	Mj	mi	Mj	Del 4977pb
Autismo	Mj	-	-	-	-	Mj	-	-	Del 7163pb
Doença multissistémica	mi	-	-	-	-	mi	-	-	Del 12807pb
Doença multissistémica	-	-	-	mi	-	mi	-	-	Del 10659pb
Miocardiopatia	Mj	-	-	Mj	-	Mj	mi	Mj	Del 11169pb
<i>Encefalopatia inespecífica</i>	Mj	-	-	-	Mj	Mj	-	-	<i>duas mut 2ª LHON</i>
<i>Encefalopatia inespecífica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>duas mut 2ª LHON</i>
<i>Autismo</i>	-	-	-	Mj	-	Mj	-	-	<i>duas mut 2ª LHON</i>
<i>Hepatopatia</i>	-	-	mi	-	-	mi	-	-	<i>uma mut 2ª LHON</i>
<i>MPP. Morte súbita</i>	mi	-	-	-	-	-	mi	-	<i>uma mut 2ª LHON</i>

Abreviaturas: Músc- músculo; Fíg- fígado; Mio- miocárdio. (-) actividade normal; mut- mutação; del- deleção; pb- pares de bases. Mj- défice *major* (actividade enzimática < 20% da média do v.r. normalizada para a citrato sintase); mi- défice *minor* (actividade enzimática ≥ 20% e < 30%). MPP- má progressão ponderal.

5.1.3 Classificação diagnóstica dos doentes

Aplicação à amostra dos critérios de Bernier para o diagnóstico de DCRM

Como se ilustra na figura 49, a aplicação retrospectiva à nossa amostra dos critérios de DCRM adaptados à criança (Bernier et al., 2002) permitiu classificar 95 doentes como tendo DCRM definida, 77 DCRM como provável e 28 DCRM como possível ou improvável (10 e 18, respectivamente). Como referido em *Material e Métodos* (página 73), o diagnóstico de DCRM foi considerado *definido* quando se associaram dois critérios maiores ou um *major* e dois *minor*; *provável*, se estavam presentes um critério *major* e um *minor* ou três ou mais *minor*; *possível*, se havia apenas um critério *major* ou dois *minor*, um dos quais laboratorial e *improvável* nos restantes casos.

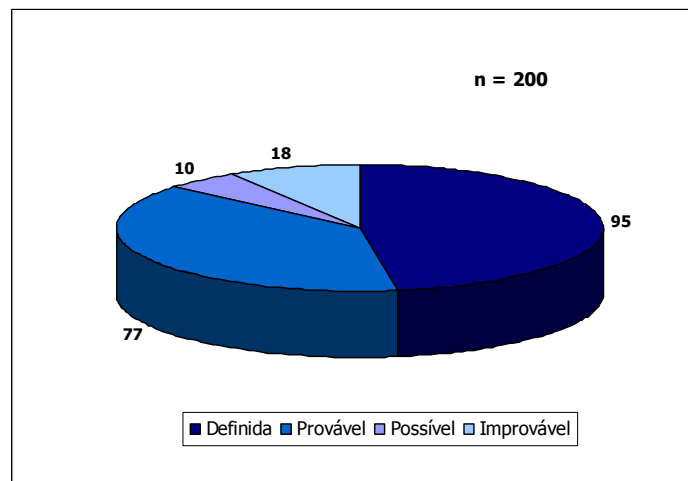


Figura 49 - Classificação dos 200 doentes segundo os critérios de DCRM de Bernier.

A tabela 27 resume a distribuição do tipo e número de critérios que permitiram o diagnóstico final dos 200 doentes, segundo a classificação de Bernier em quatro níveis de probabilidade diagnóstica: definido, provável, possível e improvável.

Na figura 50 resume-se os critérios maiores registados em 100 crianças. Dezoito doentes preenchiam critérios clínicos *major*. Quatro crianças cumpriam o critério clínico *major* de uma *combinação inexplicada de sintomas multissistémicos, curso progressivo ou história familiar sugestiva de doença mitocondrial e exclusão de outras causas*. A presença de uma síndrome mitocondrial clássica verificou-se em 14 casos (7% da amostra): síndrome de Leigh (oito) e encefalopatia letal infantil, síndrome de Pearson, *LHON*, *KSS*, *NARP* e *MELAS*, um caso de cada. Em três crianças com síndrome mitocondrial clássica (uma *NARP* e duas síndromes de Leigh) não foram reunidos critérios de DCRM definida, mas apenas de DCRM provável.

Tabela 27 - Critérios clínico-laboratoriais que permitiram o diagnóstico final nos 200 casos.

		Critérios Clínicos					
		0	1m	2m	≥3m	1M	Total
Critérios laboratoriais	0	1*	3	6	7	1	18
	1m	1	9	17	20	2	49
	2m		7	12	13	1	33
	3m				4	1	5
	1M		2	7	9		18
	1M+1m		16	22	19	8	65
	1M+2m		3		3		6
	2M+1m				1	4	5
	2M+2m					1	1
	Total	2	40	64	76	18	200

Definido	Provável	Possível	Improvável
----------	----------	----------	------------

Abreviaturas: M= *major* m= *minor*; os números em cada célula correspondem ao nº de casos que cumprem os critérios de diagnóstico nesta tabela de dupla entrada; a coloração de fundo corresponde ao grau de diagnóstico.

1* - Um dos casos de *morte súbita* não pontuou clínica nem laboratorialmente: após reanimação cardíaca, manteve-se em morte cerebral, tendo a lactacidémia normalizado e o estudo da CRM e do mtDNA sido normal.

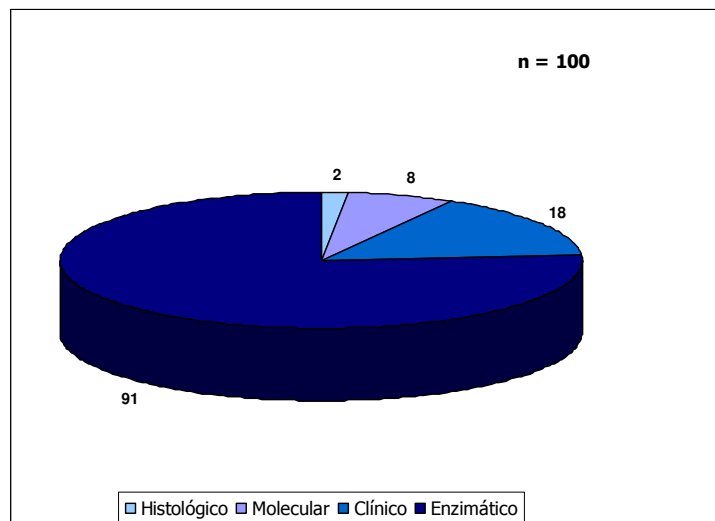


Figura 50 - Diagnóstico de DCRM - critérios maiores registados em 100 doentes.

Em 90 casos havia um défice enzimático de um ou mais complexos da CRM inferior a 20% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase em pelo menos um tecido e num outro, um défice entre 20 e 30% do mesmo complexo em dois tecidos.

Oito doentes cumpriram critérios moleculares *majores*: deleções e mutações patogénicas do mtDNA em dois e três casos, respectivamente e mutações do nDNA em três.

Dois doentes apresentaram *RRF* em mais de 2% das fibras em biópsia muscular, critério histológico *major*.

Em 182 crianças não foram registados critérios clínicos *major*. Os critérios clínicos *minor* mais frequentemente observados nesse grupo foram neurológicos (em 158 casos), nutricionais (92), oftalmológicos (47), musculares (35), hepáticos (27) e cardíacos (22), como se ilustra na figura 51.

De entre os critérios hepáticos é de notar que nos nossos doentes o tipo de esteatose hepática - macrovacuolar, microvacuolar ou mista - (integrada nos critérios clínicos *minor* da classificação de Bernier) não se correlacionou com o diagnóstico final.

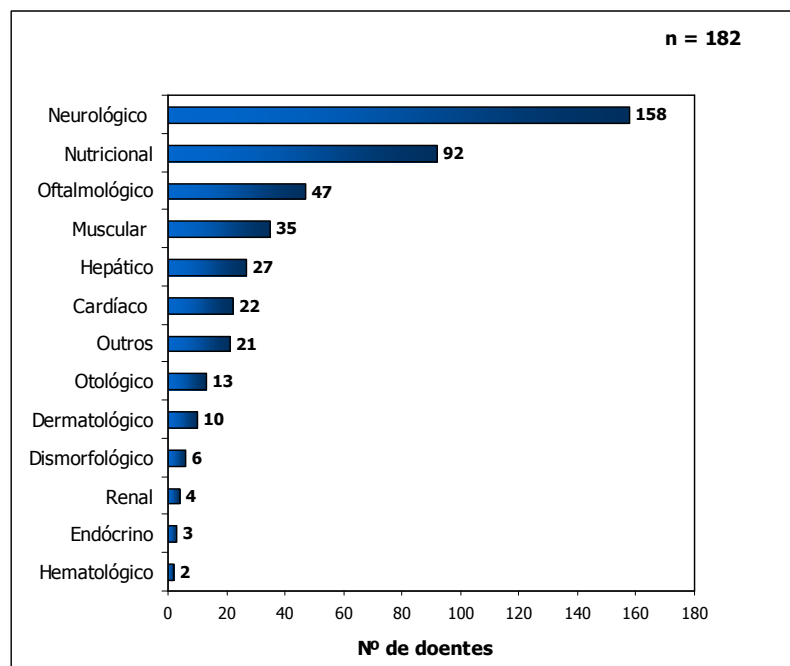


Figura 51 - Diagnóstico de DCRM - critérios clínicos *minores* registados em 182 doentes.

Os critérios laboratoriais *minores* observados nos nossos doentes estão resumidos na figura 52.

Na figura 53 dá-se uma perspectiva global da distribuição relativa dos critérios laboratoriais nos 200 doentes.

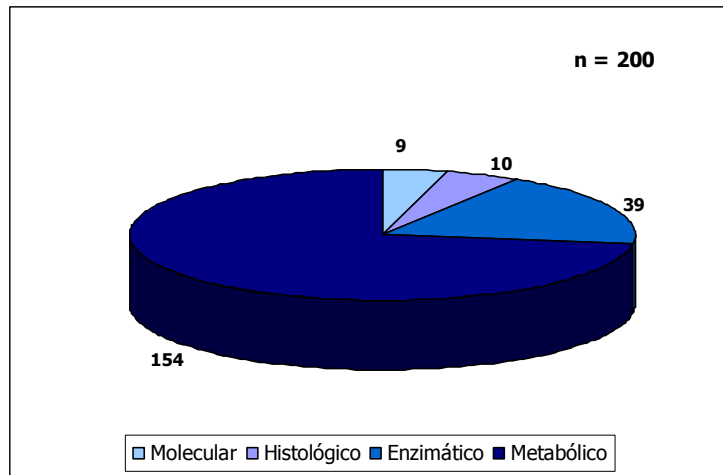


Figura 52 - Diagnóstico de DCRM - critérios laboratoriais *menores* em 200 doentes.

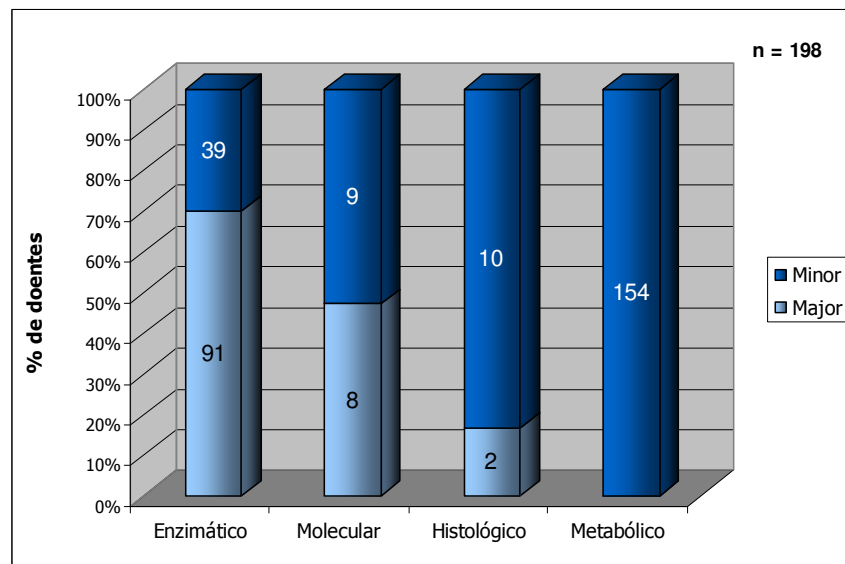


Figura 53 - Diagnóstico de DCRM - critérios laboratoriais em 200 doentes.

Por definição, os critérios metabólicos são considerados *menores*.

Diagnóstico final

Quanto ao diagnóstico final, em 38 crianças (19%) chegou-se a um outro diagnóstico etiológico. Setenta e oito crianças (39%) tiveram o diagnóstico de DCRM definida primária. Em 84 doentes (42%) não se chegou a um diagnóstico etiológico. Estes foram classificados como DCRM primária provável (61 casos), possível (nove) ou improvável (14) (figura 54).

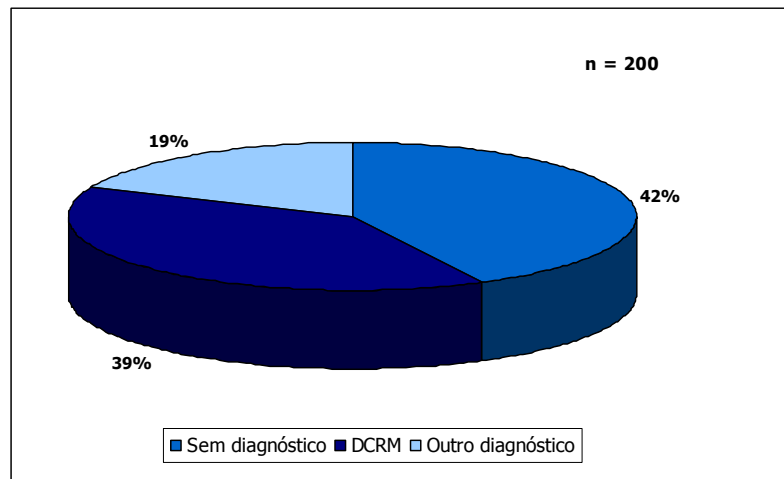


Figura 54 - Diagnóstico final dos 200 doentes em estudo.

Em 38 dos 200 doentes (17 dos 95 casos com critérios de DCRM definida; 16 dos 77 casos de DCRM provável e cinco dos 28 casos de DCRM possível ou improvável) chegou-se a outro diagnóstico etiológico, pelo que as alterações da função mitocondrial, quando presentes, foram consideradas secundárias (figura 55).

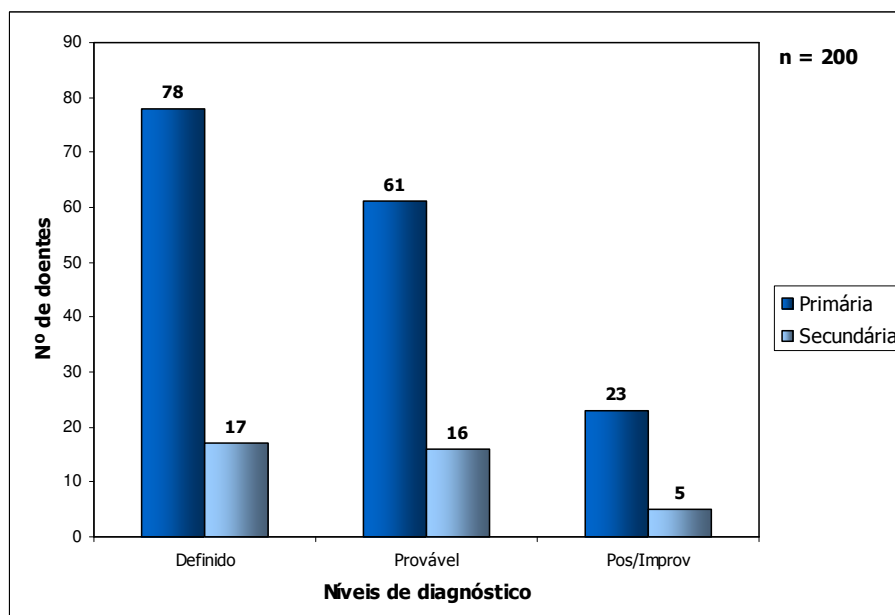


Figura 55 - Diagnóstico final em 200 doentes.

Em 38 casos (22% dos definidos, 26% dos prováveis e 22% dos possíveis ou improváveis) chegou-se a outro diagnóstico etiológico. As alterações da função mitocondrial, quando presentes, foram consideradas secundárias.

De entre os outros diagnósticos etiológicos, encontrados em 38 doentes, o grupo das outras doenças hereditárias do metabolismo foi o mais representado, com 12 casos (tabelas 28 e 29).

Tabela 28 - Outros diagnósticos etiológicos em 38 doentes.

n=38 doentes	Total	DCRM definida 2^a
Outras DHM	12	4
Infecção	10*	7
Cromossomopatia	4	1
Glicogenose x	3	1
Hipotiroidismo	2	1
Hipoxia/isquémia	2	1
Outras causas	7**	3
Total diagnósticos	40	18
Total de doentes	38	17

Abreviaturas: DHM - doença hereditária do metabolismo. * Associada a outro diagnóstico em dois casos. ** Outras causas: síndrome de Shwachman-Diamond; síndrome de Noonan; distrofia muscular de Ullrich; doença celíaca com miocardite viral; falência hepática por intoxicação com paracetamol; paralisia cerebral; pneumonia/golpe de calor.

Tabela 29 - Outras doenças hereditárias do metabolismo em 12 doentes.

Outras Doenças Hereditárias do Metabolismo		
	Total	DCRM Definida
Doença da Glicosilação das Proteínas	2	2
Doença de Pompe	2	0
Défice Múltiplo das AcilCoA Desidrogenases	2	1
Défice da Piruvato-Desidrogenase	1	0
Défice do Cofactor do Molibdénio	1	0
Glicogenose tipo IV	1	0
Défice Hidroxi-AcilCoA Desidrogenases de Cadeia Longa	1	1
Leucodistrofia Metacromática	1	0
Lipofuscinose Ceróide Neuronal	1	0
Total	12	4

Quatro doentes com o diagnóstico final de outra doença hereditária do metabolismo cumpriram critérios de DCRM definida: dois casos de doença da glicosilação das proteínas (*Congenital Disorders of Glycosilation - CDG*), a criança com Défice das Hidroxiacil-CoA Desidrogenases de Cadeia Longa (LCHADD) e uma das duas crianças com Défice Múltiplo das Acil-CoA Desidrogenases (MADD), mais precisamente com défice da respectiva oxido reductase (a outra criança com MADD apresentava deficiência da flavoproteína transportadora de electrões e cumpria critérios de DCRM provável).

Os outros diagnósticos de doença hereditária do metabolismo desta série foram: doença de Pompe (dois casos) e défice da piruvato desidrogenase, glicogenose tipo IV, défice do cofactor do molibdénio, leucodistrofia metacromática e lipofuscinose ceróide neuronal (um caso cada). Em três doentes foi documentada acumulação significativa de glicogénio no músculo mas não se chegou a um outro diagnóstico, pelo que foram designados como sofrendo de glicogenose x. Uma delas, com sobrecarga de glicogénio no músculo e no fígado, cumpriu critérios de DCRM definida.

A infecção (viral ou presumivelmente viral em nove casos) foi o segundo grupo etiológico mais frequente. Num recém-nascido foi documentada sepsis a *Streptococcus Faecalis* e *Enterobacter*. Este caso e outros seis com infecção viral demonstrada ou presumida (a herpes vírus e Epstein-Barr, a vírus Epstein-Barr, a adenovírus com falência hepática, a parvovírus e meningoencefalite e peri-miocardite *virais*) cumpriam critérios de DCRM definida. A clínica e evolução destes doentes estão resumidas na tabela 15 (página 106).

Em duas crianças (com os diagnósticos de glicogenose x e de doença celíaca) associou-se infecção viral confirmada (citomegalovirose pré-natal) ou presumida (peri-miocardite na necrópsia), respectivamente.

Os outros diagnósticos associados a critérios de DCRM definida corresponderam a intoxicação por paracetamol com insuficiência hepática, descolamento placentar com isquémia perinatal aguda, cromossomopatia, hipotiroidismo central no contexto de panhipopituitarismo e distrofia muscular de Ullrich.

A idade aquando da colheita de tecidos realizada por suspeita de DCRM variou entre o primeiro dia de vida e os 18 anos, com uma mediana de 4 e uma média de 5 anos (figura 56).

Como se ilustra na figura 57, a demora média no diagnóstico foi calculada em 4,4 anos (0 dias a 18 anos; mediana: 2,8 anos). Em 27 casos, o intervalo entre o início das manifestações clínicas e o diagnóstico foi de 10 ou mais anos.

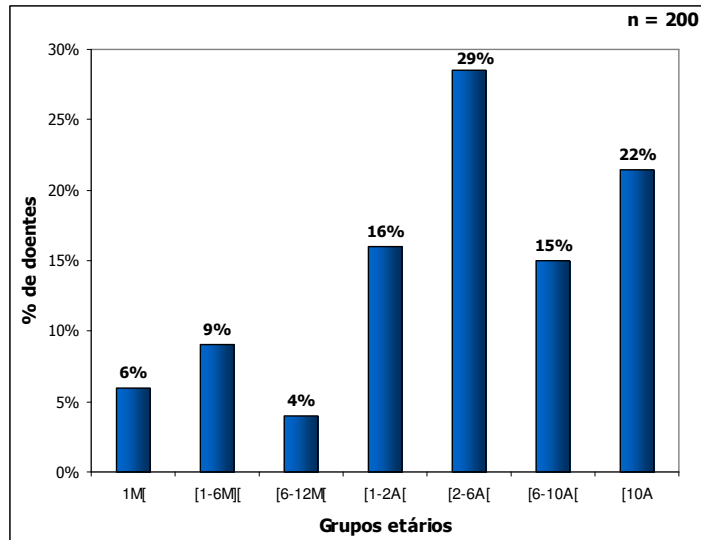


Figura 56 - Idade da colheita de tecidos em 200 doentes.

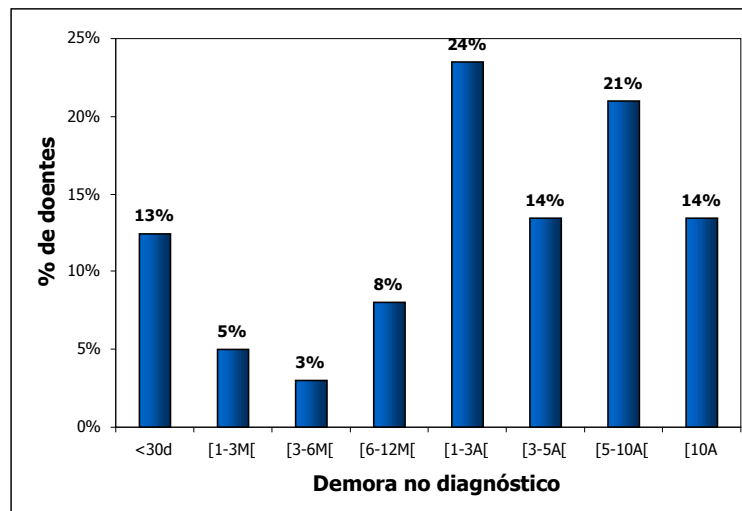


Figura 57 - Demora no diagnóstico em 200 doentes.

Como demonstrado na figura 58, ao longo do período de estudo verificou-se uma tendência para o aumento do número de doentes agudos com episódio fatal ou incapacitante e uma diminuição do número de doentes crónicos com agudização fatal ou incapacitante. O número de doentes crónicos investigados manteve-se praticamente constante.

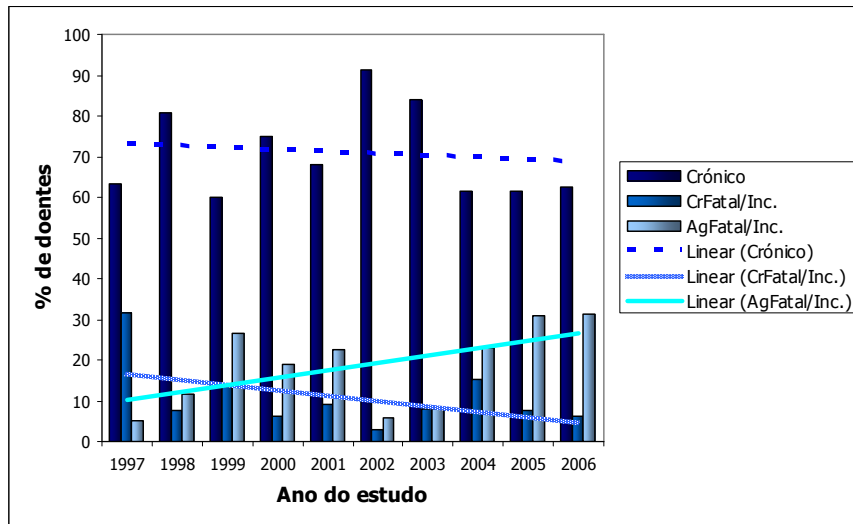


Figura 58 - Evolução do tipo de doente investigado ao longo do período do estudo.

% de doentes- nº de doentes/ nº total de casos estudados no ano em causa.

Tendência ao aumento do número de doentes agudos com episódio fatal ou incapacitante, à diminuição do número de doentes crónicos com agudização fatal ou incapacitante e à relativa estabilidade do número de doentes crónicos investigados.

Abreviaturas: Crónico- doentes crónicos; CrFatal/Inc- doentes crónicos com agudização fatal ou incapacitante; AgFatal/Inc- doentes agudos com episódio fatal ou incapacitante.

Feita a análise do diagnóstico final por ano do estudo, assistiu-se a uma tendência ao decréscimo de diagnósticos de DCRM e a aumento dos casos sem diagnóstico. O número de outros diagnósticos manteve uma linha de tendência estável (figura 59).

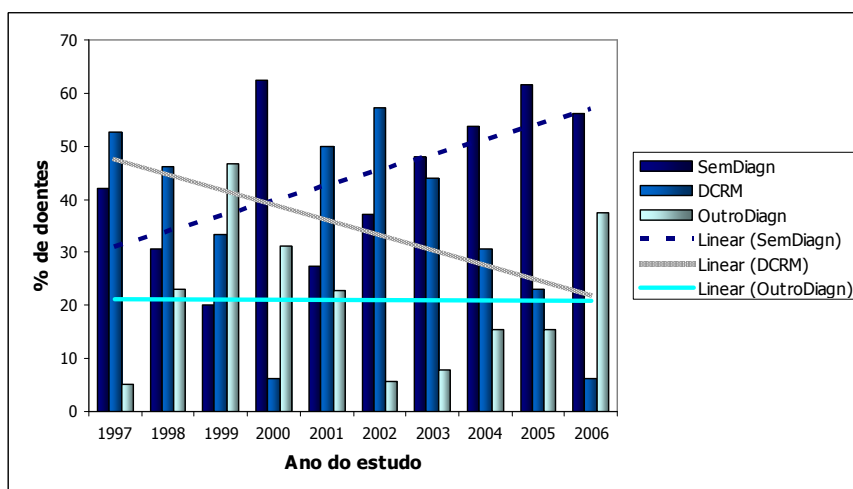


Figura 59 - Evolução do diagnóstico final ao longo do período do estudo.

% de doentes- nº de doentes/ nº total de casos estudados no ano em causa. Tendência ao decréscimo da percentagem de doentes com DCRM, ao aumento relativo dos casos sem diagnóstico e à estabilidade da % de doentes com outros diagnósticos.

Abreviaturas: SemDiagn- sem diagnóstico etiológico; OutroDiagn- outro diagnóstico.

5.1.4 Análise de alguns aspectos particulares da amostra

Factores de prognóstico vital

Investigou-se a relação entre a mortalidade e o início dos sintomas no primeiro semestre de vida e o tipo de apresentação, NM/ENM. Estabeleceu-se curvas de sobrevivência para os parâmetros mais relevantes, a saber: envolvimento cardíaco, hepático, hiperlactacidémia, acidose láctica, hiperalaninémia e diagnóstico final.

Quando os sintomas se iniciaram no primeiro semestre de vida, a mortalidade foi mais elevada (34,7% *versus* 14,6%; $p=0,002$).

A apresentação ENM esteve também ligada a um pior prognóstico (faleceram 23% dos 153 casos de apresentação NM e 51% dos 47 do grupo ENM; $p=0,000$).

A sobrevivência foi independente do género (Log Rank – 0,726; masculino/feminino: média 8,4 *versus* 9,5) e do registo de hiperlactacidémia em pelo menos uma ocasião (Log Rank – 0,586; média: 9,1 *vs* 8,8 anos).

Foram factores associados a mortalidade mais elevada: o envolvimento cardíaco (Log Rank – 0,000; média: 6,4 *versus* 9,3 anos) e o compromisso hepático (Log Rank – 0,000; média: 4,3 *versus* 9,7 anos) (figura 60).

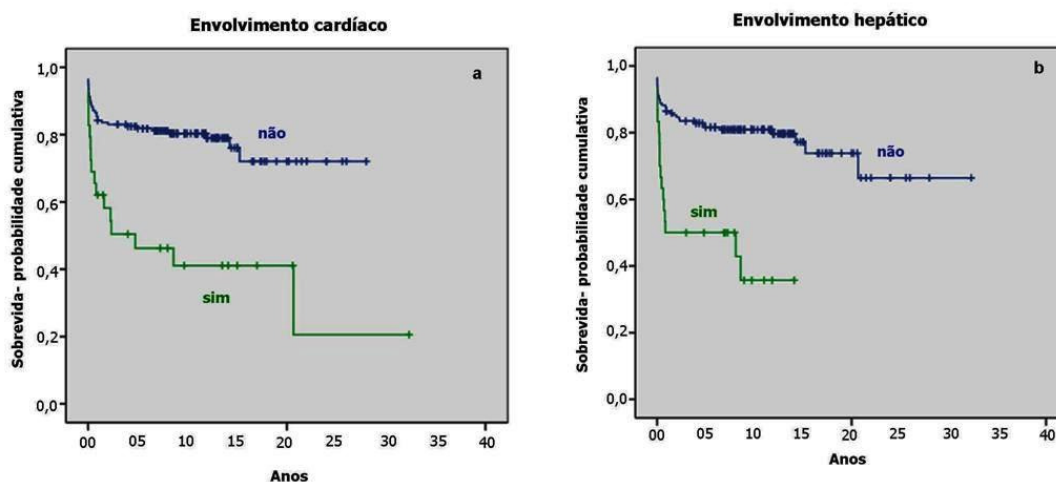


Figura 60 - Análise de factores clínicos que influenciaram a sobrevivência em 200 doentes.

(a) presença de envolvimento cardíaco (b) presença de envolvimento hepático.

Do mesmo modo, os doentes com hiperlactacidémia documentada em mais de três ocasiões (Log Rank – 0,011; média: 8,2 *versus* 9,8 anos), com acidose láctica (Log Rank – 0,000; média: 3,0 *versus* 9,6 anos) ou com hiperalaninémia (Log Rank – 0,040; média: 8,6 *versus* 9,5 anos), sobretudo se superior a 450 μM (Log Rank – 0,004; média:

8,2 versus 9,6 anos), tiveram pior prognóstico (figura 61)

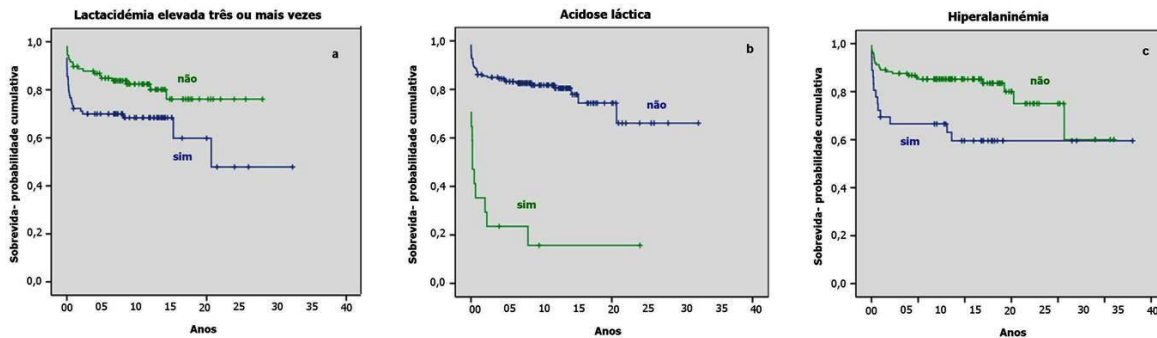


Figura 61 - Análise de factores laboratoriais que influenciaram a sobrevida em 200 doentes.

(a) presença de hiperlactacidemia sem acidose em três ou mais ocasiões; (b) presença de acidose láctica; (c) presença de alanina plasmática superior a 450 μ M.

Os casos nos quais foi encontrado um outro diagnóstico etiológico estiveram associados a menor sobrevida (Log Rank – 0,000; média de sobrevida: 4,8 versus 9,8 anos) e a óbito mais precoce (Log Rank-0,000; média de idade de morte 0,5 versus 3,2 anos), como ilustrado na figura 62.

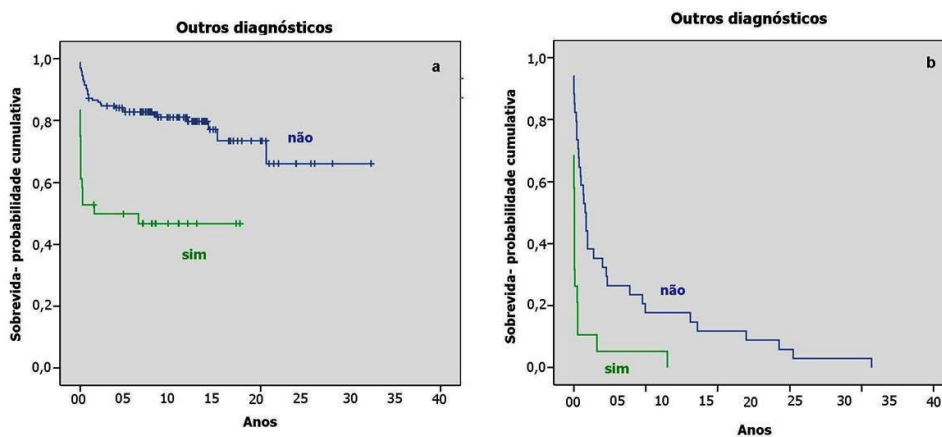


Figura 62 - Sobrevida e diagnóstico final.

(a) os doentes com um outro diagnóstico final tiveram menor sobrevida (análise em 200 doentes) e (b) óbito no primeiro semestre de doença (análise dos 53 doentes falecidos).

A mortalidade foi mais acentuada (maior percentagem de crianças falecidas) e mais precoce (maior percentagem de falecimentos na primeira semana e no primeiro semestre

de doença) no grupo com outros diagnósticos (tabela 30).

Tabela 30 - Grupos diagnósticos *versus* mortalidade.

	Óbitos	1ª semana doença	1º semestre doença
SemDiagn	12%	10%	20%
DCRM	30%	9%	52%
OutroDiagn	53%	30%	85%

Abreviaturas: SemDiagn- sem diagnóstico etiológico; DCRM- doença da cadeia respiratória mitocondrial definida; OutroDiagn- outro diagnóstico etiológico.

Circunstâncias de colheita de tecidos para diagnóstico

Procurou-se saber se as circunstâncias de colheita de tecidos para diagnóstico [(em todos os casos de colheita *post mortem* imediata (25 crianças), em sessão operatória própria (154) ou programada com outra cirurgia (21)] se relacionaram com o diagnóstico final e a detecção de défice funcional dos complexos I a V da CRM no músculo, no fígado e no global dos tecidos.

Como se evidencia nas figuras 63 e 64, chegou-se a um outro diagnóstico final em 48% dos casos com colheitas *post mortem* e em 14% dos doentes submetidos a colheitas *in vivo*. Em comparação com as colheitas *post mortem*, constatou-se uma relação estatisticamente significativa entre as colheitas *in vivo* e doença primária ($p=0,000$; $OR=5,8$), DCRM definida, ($0,009$; $OR=3,3$), DCRM definida primária versus definida secundária ($p=0,000$; $OR=8,6$) e normalidade dos complexos I a V da CRM no global dos tecidos ($p=0,039$; $OR=3$).

Nos doentes com colheitas *in vivo*, aquelas em que foram realizadas em sessão operatória própria tiveram outros diagnósticos em 15% dos casos em comparação com 5% dos submetidos a colheitas *oportunistas* (isto é, em que se aproveitou a sessão operatória de outras cirurgias). Da análise estatística dos parâmetros acima referidos, concluiu-se que os doentes com colheitas programadas tiveram mais diagnósticos de DCRM definida ($p=0,014$; $OR=3,8$) e definida primária ($p=0,012$; $OR=4,5$), bem como défice da CRM no músculo ($p=0,008$; $OR=3,5$) e no total dos tecidos ($p=0,003$; $OR=4$) do que os doentes com colheitas *oportunistas* (figuras 63 e 64).

A distribuição dos casos por níveis de diagnóstico de DCRM, primária e secundária, relacionado com o tipo de colheita está representada na figura 64.

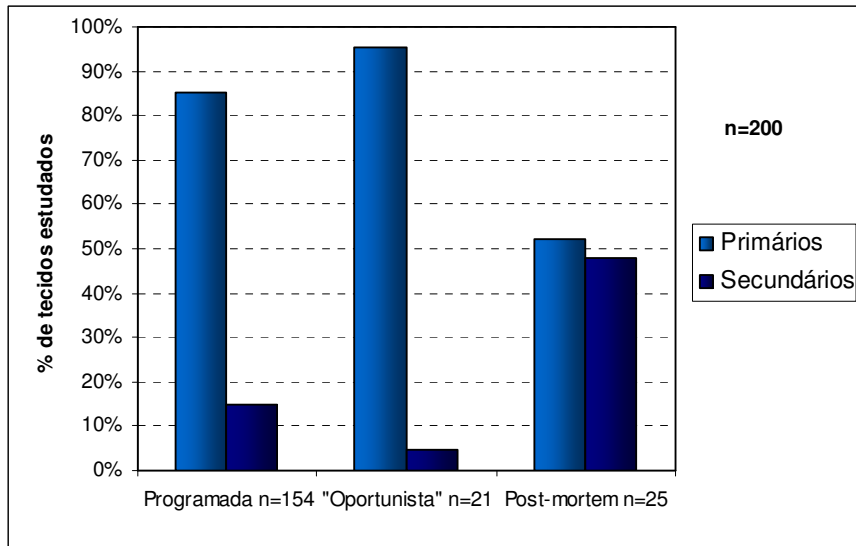


Figura 63 - Condições de colheita de tecidos e tipo de diagnóstico final, primário ou secundário.

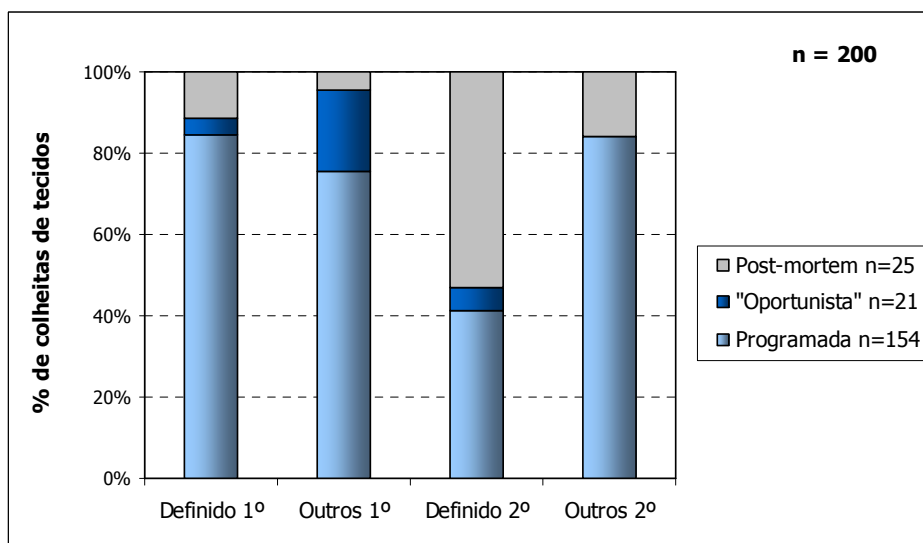


Figura 64 - Condições da colheita de tecidos e diagnóstico final em 200 doentes.

Definido 1º - DCRM definida; Outros 1º - Sem diagnóstico; Definido 2º - Outro diagnóstico, com critérios de DCRM definida; Outros 2º - Outro diagnóstico, sem critérios de DCRM definida.

Medicação aquando da colheita de tecidos para diagnóstico

Analisou-se a medicação aquando das colheitas de tecidos para estudos funcionais da CRM, nomeadamente o número e tipo de fármacos: anticonvulsivantes (em particular o valproato de sódio), antipsicóticos (risperidona e outros), antibióticos (incluindo os anti-virais) e medicamentos para tratamento da insuficiência cardíaca, de sintomas digestivos, de doença hepática e outros (figura 65). Noventa e três crianças (46,5%)

estavam medicadas aquando da colheita de tecidos para estudos mitocondriais, 73% das quais em politerapia. Os fármacos mais frequentemente em causa foram os anticonvulsivantes (45 casos), os antibióticos (19) e os antipsicóticos (15).

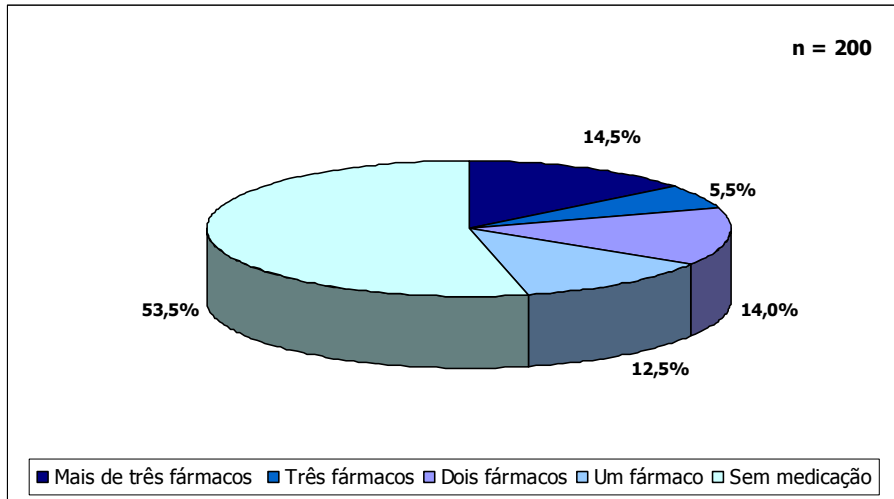


Figura 65 - Medicação aquando da colheita de tecidos para estudos mitocondriais.

Vinte e cinco crianças estavam medicadas com valproato de sódio, só ou em associação com outros anticonvulsivantes (figura 66).

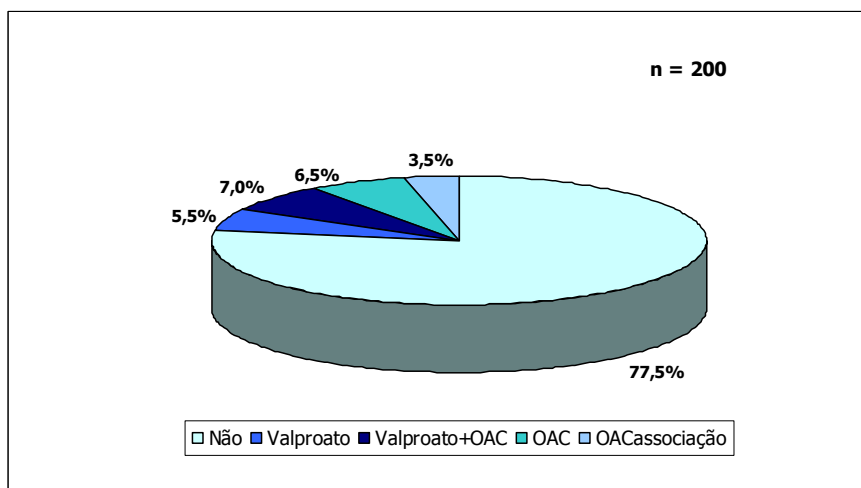


Figura 66 - Medicação anticonvulsivante aquando do estudo mitocondrial.

Abreviatura: OAC- outros fármacos anticonvulsivantes.

A risperidona era o fármaco usado por 11 dos 15 doentes medicados com antipsicóticos. Em três casos estava associado a outro medicamento do mesmo grupo.

Três crianças estavam medicadas com aciclovir intravenoso (associado a antibióticos em duas). Fármacos para tratamento de insuficiência cardíaca, de sintomas do foro digestivo, de doença hepática e outros foram registados em 20, 16, sete e nove casos, respectivamente.

Procurou-se uma correlação entre a toma de fármacos e o seu tipo aquando do diagnóstico (sem medicação, com três ou mais fármacos, anticonvulsivantes, valproato de sódio, antipsicóticos, risperidona, antibióticos) e a presença de dados laboratoriais relevantes no diagnóstico [acidúria orgânica, hiperlactacidémia, hiperalaninémia, hiperprolinémia, défices dos complexos da CRM (I no músculo, IV no músculo, I a V no músculo, I a V fígado e I a V no global dos tecidos)] e entre a medicação e o diagnóstico de DCRM definida.

Neste grupo de doentes a toma de qualquer medicação esteve estatisticamente relacionada com o défice da CRM no global dos tecidos estudados ($p=0,037$; $OR=2$) e o diagnóstico de DCRM definida [55,8% dos com DCRM definida e 38,1% dos sem DCRM definida faziam medicação ($p=0,012$; $OR=2$)]. Por outro lado, o uso de três ou mais medicamentos associou-se a um mais frequente diagnóstico de DCRM definida ($p=0,077$; $OR=2$) e de hiperprolinémia ($p= 0,029$; $OR=3,5$).

A detecção de ácidos orgânicos anormais esteve relacionada com o uso de três ou mais medicamentos ($p=0,043$; $OR=2,4$). Da análise dos subgrupos de fármacos, apenas o uso de antibióticos mostrou relação significativa com a demonstração de ácidos orgânicos anormais ($p=0,034$; $OR=3,2$). A toma de valproato de sódio ou de antipsicóticos não esteve associada a alterações nos ácidos orgânicos urinários.

Do mesmo modo, não houve associação entre o uso da risperidona e o défice do complexo I ou da CRM em geral.

Caracterização dos doentes com o diagnóstico de DCRM

Crianças com o diagnóstico de DCRM definida primária -Setenta e oito doentes foram classificados segundo os critérios de Bernier como tendo DCRM definida primária, isto é, sem que se tivesse chegado a um outro diagnóstico mais plausível. A análise deste grupo de doentes, que se distribuíram igualmente por ambos os sexos, foi objecto de publicação (Diogo et al., 2009), transcrita em Anexos, páginas 283- 288.

Segue-se uma análise comparativa entre o grupo de doentes com DCRM definida primária e os outros grupos.

As crianças com DCRM definida primária eram fruto de uma primeira gestação em 42% dos casos. Na altura da biópsia diagnóstica, 37% eram filhos únicos, comparativamente com 30% dos casos sem DCRM definida primária.

A idade materna (28 anos *versus* 27,5 anos), complicações na gravidez, idade gestacional, parto distóxico (33,4% *versus* 41,8%), asfixia perinatal (14,1% *versus* 22,1%) e internamento no período neonatal (29,5% *versus* 32,8%) foram semelhantes no grupo das DCRM definidas primárias e no dos outros doentes. As complicações do grupo hipertensão arterial/ pré-eclâmpsia/ colestase gravídica foram menos frequentes no primeiro grupo, diferença sem significado estatístico.

Não houve dissemelhanças entre os dois grupos, com e sem DCRM definida primária, nos antecedentes familiares no que diz respeito a consanguinidade (7,7% *versus* 9%) e mortes inesperadas em familiares próximos (26,9% *versus* 22,1%). As mortes inesperadas pré-natais foram menos frequentes no grupo definido primário do que nos outros (28,6% *versus* 55,6%). O mesmo se verificou quando se limitou a análise ao núcleo familiar restrito (irmãos e progenitores) (7,7% *versus* 12,3%). Em relação às mortes inesperadas em familiares adultos ocorreu o contrário (14,3% *versus* 3,7%). Os dois únicos casos de pais falecidos pertenciam ao grupo de DCRM definida primária.

Há mais vezes referência a antecedentes familiares patológicos maternos do que paternos em ambos os grupos: 10,3% *versus* 7,4% no dos com DCRM definida primária e 2,6% *versus* 0,8% nos outros doentes.

O início dos sintomas no grupo das DCRM definidas primárias ocorreu entre o primeiro dia de vida e os 8 anos, verificando-se antes dos 6 meses de idade em cerca de metade (55%) dos casos (mediana 4 meses; média 9,5 meses). A idade e tipo de apresentação (isto é, NM/ENM, doença crónica/ episódio agudo grave) foram semelhantes nos dois grupos em apreciação.

Da análise da frequência dos sinais clínicos de apresentação e evolução não se encontrou diferença entre o grupo com DCRM definida primária e as restantes crianças, excepto no que se refere à ocorrência de malformações e/ou dismorfismos, mais raro no grupo das definidas primárias (7,7 *versus* 19,8%; $p=0,021$).

A mediana da idade da biópsia foi de 2,9 anos *versus* 4 anos e a mediana da demora diagnóstica foi de 2 *versus* 3 anos no grupo de doentes com DCRM definida primária e no dos outros, respectivamente.

Faleceram ou viram o seu estado agravar-se 42,3% e 37,7% crianças no grupo de DCRM definida primária e no dos outros, respectivamente.

O óbito ocorreu em 29,5% dos casos com DCRM definida primária e em 24,6% nos outros. Sobreveio nos primeiros 6 meses de evolução em 47,8% e 36,7% dos casos (em 8,7% e 23,3% na primeira semana de doença), respectivamente. A mediana da idade do óbito foi idêntica (0,7 *versus* 0,8 anos).

O tempo de evolução foi, no grupo com DCRM definida primária e no dos outros, respectivamente de 0,7 e 0,4 anos nos que faleceram e 11,6 e 8,8 anos nos sobreviventes. A idade média e mediana dos sobreviventes no fim do estudo era de 13,2 e 11,5 anos e de 13 e 11 anos, respectivamente.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as crianças com DCRM definida primária e os outros doentes nos restantes parâmetros analisados no que respeita à história familiar e pessoal e à apresentação e evolução clínicas.

Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros anteriormente referidos entre os doentes com DCRM definida primária (n=78) e os com DCRM possível ou improvável primária (n=23).

DCRM definida primária e secundária - Na revisão dos doentes com diagnóstico de DCRM definida primária (n=78) e secundária (n=17), considerou-se, para além dos dados clínicos anteriormente referidos, outros parâmetros clínicos e laboratoriais, alguns dos quais foram usados como critério de diagnóstico: envolvimento neurológico, metabólico, hepático, cardíaco e renal, atraso de crescimento, atraso/regressão do desenvolvimento psicomotor, dados imagiológicos do cérebro, níveis de lactato no *líquor*, lactacidémia, níveis plasmáticos de alanina e de prolina e ácidos orgânicos urinários.

Verificou-se que no grupo das crianças com DCRM definida primária houve maior incidência de doença crónica [71,8% *versus* 23,5% (p= 0,000)]. No grupo de DCRM definida primária a apresentação NM [77 *versus* 29,4% (p=0,000)] e a evolução NM [85,5 *versus* 69,2 % (p=0,002)] foram mais frequentes. A evolução multissistémica foi mais frequente no grupo de DCRM definida secundária, diferença sem significado estatístico [25% *versus* 46% (p=0,117)].

Nos doentes com DCRM definida secundária a idade da colheita de tecidos foi mais precoce [1,8 *versus* 5,2 anos (p=0,001)] e a demora diagnóstica, mais curta [0,98 *versus* 4,4 anos (p=0,000)]. Nestes, verificou-se uma maior mortalidade [76,5 *versus* 29,5% (p=0,000)], e uma mortalidade mais precoce [92% *versus* 52% nos primeiros seis meses de doença (p=0,014)]. O tempo de evolução foi conseqüentemente mais curto nos falecidos daquele grupo [0,3 *versus* 2,1 anos (p=0,011)]. O tempo de evolução dos sobreviventes foi semelhante (11,2 anos) nos dois grupos.

Na tabela 31 representam-se os resultados da análise comparativa de alguns parâmetros clínicos relevantes nos dois subgrupos de DCRM definida.

Não se observaram diferenças na frequência de hiperlactatorraquia ou de elevação plasmática do lactato, alanina ou prolina, de acidúria orgânica ou de alterações histológicas entre os dois grupos de DCRM definida, primária e secundária. Nos doentes em que se obteve imagem cerebral (TAC e/ou RMN), havia alterações em 69% dos 67 casos com DCRM definida primária e em todos os 10 casos com DCRM definida secundária (p=0,045).

Tabela 31 - Análise de alguns parâmetros clínicos nos dois subgrupos de DCRM definida.

DCRM Definida	Primária (n=78)		Secundária (n=17)		p
	Nº	%	Nº	%	
Apresentação					
Neurológica	58	74	7	41	0,008
Coma	3	4	5	29	0,001
Acidose láctica e/ou hipoglicémia					
Hepática	3	4	5	29	0,001
Insuficiência hepática	1	1	4	24	0,000
Evolução					
Neurológica	71	91	10	59	0,001
Mov.anormais e/ou distonia*	19	24	0	0	0,025
Atraso e/ou RDPM** #	63	81	5	29	0,000
Coma	10	13	5	29	0,089
Atraso de crescimento	24	31	2	12	0,111
Envolvimento hepático #	11	14	9	53	0,000
Envolvimento cardíaco	15	19	7	41	0,052
Miocardiopatia	11	14	4	24	0,334
Envolvimento renal	4	5	4	24	0,013

Mantém-se diferença com significado estatístico entre os dois grupos quando se considera isoladamente o atraso e a regressão do desenvolvimento psicomotor ou os vários tipos de envolvimento hepático (hepatomegalia, colestase, citólise, insuficiência hepática).

Abreviaturas: * Mov.- movimentos ** RDPM- regressão do desenvolvimento psicomotor.

5.2 Doença mitocondrial na criança na Região Centro de Portugal

5.2.1 Incidência

Considerou-se o número de nado-vivos na Região Centro no intervalo de 8 anos (1989-1996), isto é, os que teriam entre 10 e 18 anos no fim do período de estudo (Osório, 1989-1996; Instituto Nacional de Estatística, 2001) e o número de casos com DCRM definida primária diagnosticados em crianças nascidas na mesma Região nesse período. A incidência da DCRM definida, com manifestação clínica até aos 10 anos de idade na Região Centro foi estimada em ~ 1 caso / 6500 nado-vivos (ou ~ 1,5 /10000). Na tabela 32 mostra-se a incidência calculada tendo por base diferentes intervalos de tempo considerados.

Tabela 32 - Estimativa da incidência de DCRM na Região Centro de Portugal.

Ano de nascimento	nº doentes	nº nado-vivos	Incidência	
1992-1996	22	116983	1/ 5317	1,9/ 10000
1991-1996	26	142508	1/ 5481	1,8/ 10000
1989-1996	29	188209	1/ 6490	1,5/ 10000

5.2.2 Prevalência

No fim do período do estudo havia 12 doentes com o diagnóstico de DCRM definida primária, vivos, residentes na Região Centro, com idades compreendidas entre os 0 e os 9 anos (inclusive). A estimativa da população entre os 0 e os 9 anos de idade na mesma região em 2006 é de 222342 crianças (Instituto Nacional de Estatística, 2007). Assim, a prevalência pontual de DCRM no fim do período de estudo na Região Centro foi calculada em 1 caso/ 18529 (ou 5,4 casos/ 100000) habitantes com menos de 10 anos de idade.

5.3 Análise da escala diagnóstica adoptada

Com o objectivo de aferir a escala diagnóstica utilizada (Bernier et al., 2002) aplicou-se à nossa série de doentes os *critérios gerais* de DCRM usados pelo grupo de Nijmegen (Wolf e Smeitink, 2002), descritos no capítulo *Material e Métodos* (página 78).

Repartidos pelas três categorias de apresentação (muscular: 31, 15,5%; neurológica: 125, 62,5% e multissistémica: 44, 22%), os 200 doentes foram classificados nos quatro grupos de diagnóstico: DCRM definida (33: 17%), provável (92: 46%), possível (69: 35%) e improvável (6: 3%) (figuras 67 a 69).

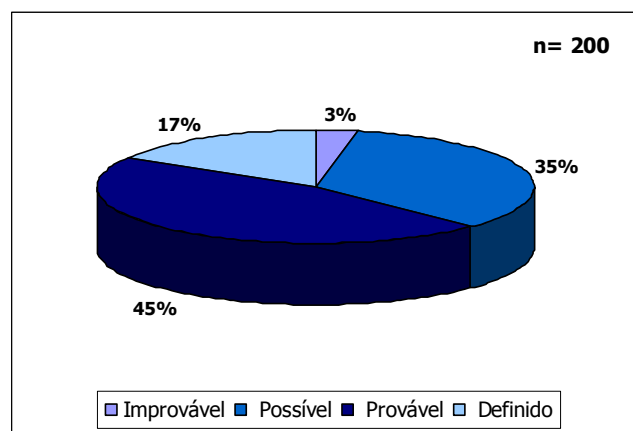


Figura 67 - Classificação dos doentes segundo os critérios gerais de Nijmegen.

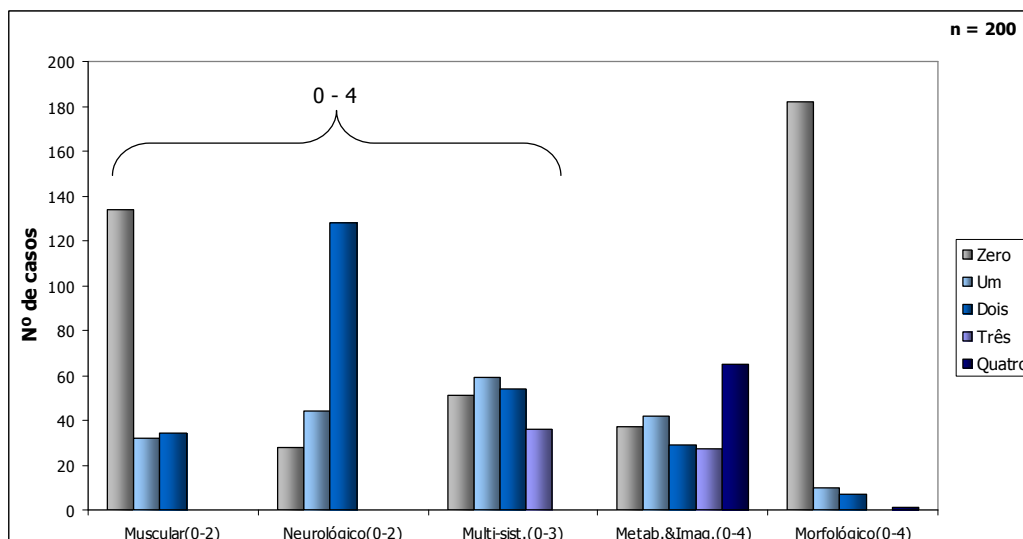


Figura 68 - Critérios clínico-laboratoriais gerais de Nijmegen preenchidos pelos 200 doentes.

O somatório das alterações clínicas (muscular, neurológico e multissistémico) pontua de zero a quatro.

Abreviaturas: Multi-sist.- multissistémico; Metab&Imag.- metabólico e imagiológico

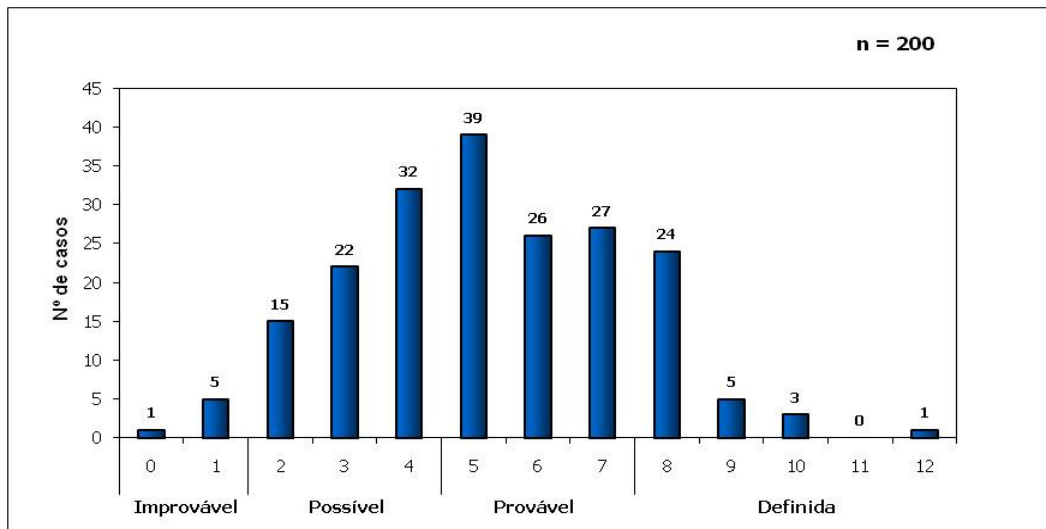


Figura 69 - Critérios clínico-laboratoriais gerais de Nijmegen preenchidos em 200 doentes.

Segundo os critérios clínico-laboratoriais gerais de Nijmegen cada doente pontua de 0 a 12.

Segundo os critérios gerais de Nijmegen, 13% das 38 crianças com doença secundária (isto é, com outro diagnóstico etiológico) e 17% dos 162 casos com doença primária tinham critérios de DCRM definida, diferença sem significado estatístico (figura 70).

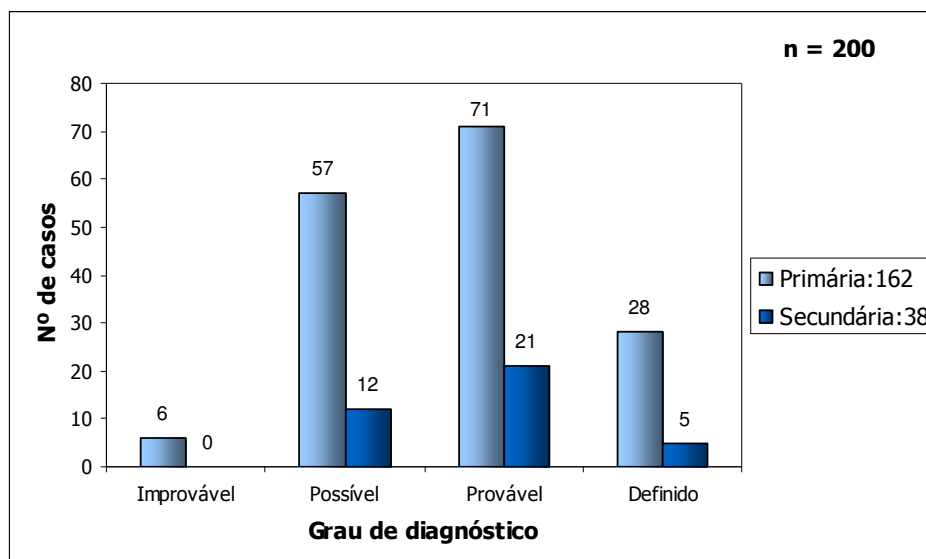


Figura 70 - Classificação diagnóstica nos 200 doentes segundo os critérios de Nijmegen.

A proporção de DCRM definida entre os casos de doença primária e secundária é semelhante.

Como delineado na figura 71, a classificação de Bernier adaptada (isto é, com exclusão dos critérios relacionados com a actividade enzimática da CRM e com o estudo molecular)

elege dois casos como definidos e 121 como prováveis, contra 33 e 92, respectivamente, na escala geral de Nijmegen.

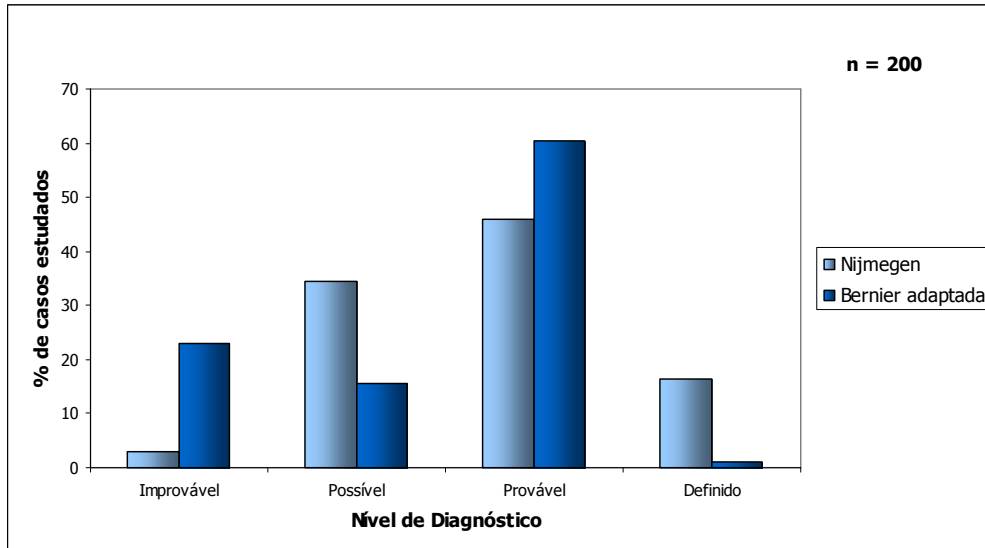


Figura 71 - Aplicação das escalas geral de Nijmegen e Bernier adaptada à amostra.

À escala original de Bernier foram retirados os resultados da actividade enzimática e do estudo molecular.

Da comparação dos resultados da aplicação das duas classificações à série de 200 doentes, constatou-se que em 83 casos (42%) se obteve o mesmo nível de diagnóstico, em 105 casos (51%) a diferença no agrupamento diagnóstico foi de um ponto e em 12 casos (6%), de dois pontos, nos quatro possíveis. Houve discrepância de um ou dois níveis *a favor* da classificação de Bernier, respectivamente em 24 e dois casos. A diferença de um ou dois níveis *a favor* da classificação de Nijmegen verificou-se em 81 e 10 casos, respectivamente.

A concordância entre as duas classificações, subdividindo a amostra em DCRM definida e DCRM não definida, foi muito baixa ($Kappa=0,05$). O valor de $Kappa$ foi de 0,427 (concordância moderada) quando se subdividiu a série em DCRM definida ou provável e DCRM possível ou improvável. Nos casos com síndrome mitocondrial, incluindo um com depleção do mtDNA (15 doentes), houve concordância de resultados em 47%.

O nível de concordância de diagnóstico foi de 43% nos sete casos com diagnóstico molecular e de 43% nas 164 crianças nas quais não foi encontrada uma outra causa para a doença, isto é, com doença primária. Considerando o grupo dos 164 casos de doença primária concluiu-se por um diagnóstico de DCRM provável ou definida em 81 doentes (49%) em ambas as classificações. Nos casos com doença secundária houve cinco catalogados como DCRM definido na classificação de Nijmegen e nenhum na de Bernier adaptada.

5.4 Estudo mitocondrial funcional realizado - perspectiva clínica

5.4.1 Cetonémia

A avaliação dos corpos cetónicos (β -hidroxibutirato e acetoacetato) e dos ácidos gordos livres circulantes foi realizada (pelo menos uma vez) em 143 doentes: 74%, 73% e 61% das crianças com o diagnóstico de DCRM definida, provável e possível/ improvável, respectivamente. Em 128 dos 143 doentes não se encontrou um outro diagnóstico (casos primários). O número de determinações variou entre uma (53 crianças) e cinco ou mais (25), com uma mediana de duas determinações.

Em 46 casos a cetonémia foi determinada mais do que uma vez no mesmo dia: antes e após uma refeição em 24 doentes, antes e após duas ou mais refeições no mesmo dia em 22 crianças e no contexto de teste de tolerância à glicose oral em sete casos.

Os níveis plasmáticos de corpos cetónicos corrigidos para os ácidos gordos livres doseados simultaneamente (cetonémia relativa) variaram entre 0,08 e 6,9 (média: 0,97; mediana: 0,68). A razão β -hidroxibutirato/ acetoacetato variou entre 0,36 e 50,2 (média: 7,8; mediana: 6,49). Detectou-se elevação pós-prandial da cetonémia (paradoxal) em 38 dos 46 doentes analisados.

Com o objectivo de valorizar a cetonémia relativa e a razão β -hidroxibutirato/ acetoacetato como critérios de diagnóstico de DCRM, os valores destes parâmetros foram relacionados com a presença de: envolvimento hepático, hiperlactacidémia, hiperalaninémia, hiperprolinémia, défice dos complexos I a V no global dos tecidos e diagnóstico final (tipo e grau: definido primário versus outros; definido primário *versus* provável primário; definido primário versus outros primários).

No conjunto dos 143 doentes verificou-se haver relação entre a cetonémia relativa e a presença de hiperlactacidémia (0,68 com lactato normal *versus* 1,05 com lactato elevado; $p=0,011$) e de défice do complexo III (cetonémia: 0,86 com III normal *versus* 1,4 com défice do complexo III; $p=0,014$).

A razão β -hidroxibutirato/acetoacetato não se correlacionou com nenhum dos parâmetros analisados.

A cetonémia relativa e a razão β -hidroxibutirato/ acetoacetato não tiveram relação com o tipo e grau de diagnóstico de DCRM, inclusive quando se comparou o grupo improvável/possível primário (14 casos; médias: 0,66 e 10,6, respectivamente para a cetonémia relativa e o quociente entre os corpos cetónicos) e grupo definido primário (65 casos; médias: 1,0 e 8,0), como se mostra na figura 72.

Nos 128 casos de doença primária não se encontrou relação com significado estatístico entre os valores da cetonémia relativa ou da razão β -hidroxibutirato/ acetoacetato e os parâmetros em análise anteriormente referidos.

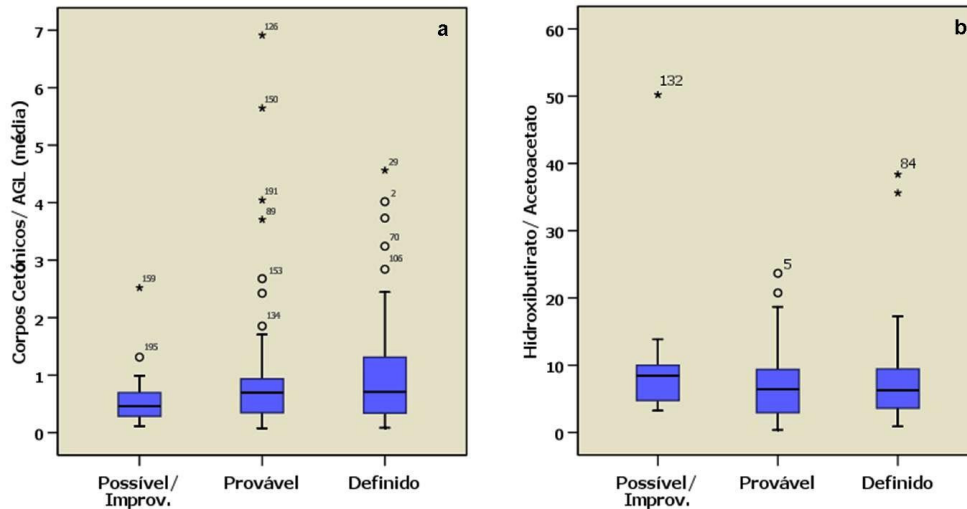


Figura 72 - Relação entre a cetonémia e o grau de diagnóstico de DCRM.

- (a) - Relação entre o ratio corpos cetónicos/ ácidos gordos livres (AGL) e o grau de diagnóstico de DCRM;
- (b) - Relação entre o ratio hidroxibutirato/ acetoacetato e o grau de diagnóstico. Improv.- improvável

A presença de cetonémia paradoxal não se correlacionou com os diversos grupos de certeza diagnóstica, o envolvimento hepático, a presença de hiperlactacidémia, de hiperalaninémia ou de hiperprolinémia, a elevação da relação lactato/piruvato plasmática (avaliada em 33 dos 46 casos) e os défices dos complexos I-V no seu conjunto.

5.4.2 Estudo polarográfico

O estudo funcional da CRM por polarografia (com os substratos malato-piruvato, succinato e duroquinol) foi realizado em linfócitos em 74 casos e em mitocôndrias isoladas de músculo em 70 casos.

No estudo em linfócitos, o consumo de oxigénio com o malato-piruvato foi sempre normal e apenas mostrou valores inferiores a 30% da média do v.r. com o succinato e o duroquinol em um e quatro dos 74 doentes, respectivamente.

Na polarografia das mitocôndrias isoladas observaram-se valores inferiores a 30% da média do v.r. em 22, 36 e 48 das 70 preparações, respectivamente para o malato-piruvato, o succinato e o duroquinol.

Para a preparação de mitocôndrias, fez-se a análise de concordância entre a oxidação do succinato, do duroquinol e do malato-piruvato e a actividade dos complexos II, III e I a IV, respectivamente, cujo resultado é referido na secção dedicada à espectrofotometria (página 154).

5.4.3 A actividade enzimática dos complexos da CRM

Expressão da actividade enzimática

A actividade dos complexos da CRM avaliada por espectrofotometria pode ser expressa de diferentes formas. Segue-se uma análise comparativa de diferentes modos de expressão da actividade enzimática do complexo IV, com o objectivo de vir a adoptar o modo e o limite de corte (*cut-off*) mais adequados para ser feito o diagnóstico de défice funcional da CRM.

Os resultados da actividade do complexo IV em mitocôndrias isoladas de músculo (89 casos) e no homogeneizado de músculo (145 casos) estão representados na tabela 33 e na figura 73.

Tabela 33 - Actividade enzimática do complexo IV expressa de diversos modos.

	Mitocôndrias n=89			Homogeneizado n=145		
	%med	%med/ CS	%méd/ II	%med	%med/ CS	%méd/ II
Normal	44	78	79	73	76	91
[20-30%[18	6	7	10	12	3
[0-20%[38	16	14	17	12	6

A actividade do complexo IV está expressa como % da média do v.r.: em nmol/min/mg proteína (%med), normalizada para a citrato sintase – CS - (%med/ CS) e normalizada para o complexo II da CRM (%méd/ II).

Mostra-se a percentagem de casos com actividade inferior a 20% da média do v.r., entre 20% e 29% da média do v.r. e normal ($\geq 30\%$ da média do v.r.) do complexo IV em mitocôndrias de músculo (89 doentes) e em homogeneizado de músculo (145 doentes).

Com o objectivo de perceber se as unidades adoptadas neste estudo (actividade enzimática corrigida para a da citrato sintase, em função da percentagem da média do v.r.) teriam sido as mais adequadas, fez-se a análise de concordância dos diferentes modos de expressar a *actividade enzimática do complexo IV* da CRM nas mitocôndrias isoladas de músculo e no homogeneizado de músculo, exposta nas tabelas 34 e 35.

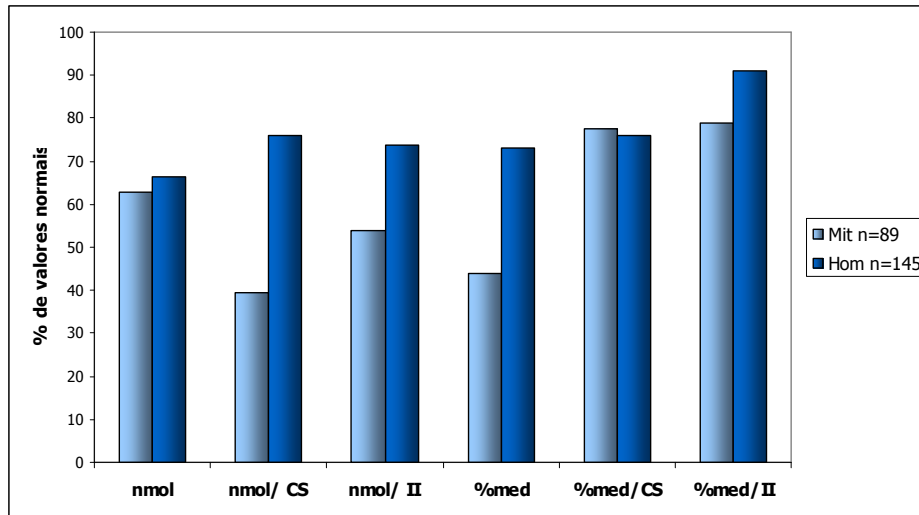


Figura 73 - Complexo IV em músculo em função da expressão da actividade enzimática.

Percentagem de amostras com valores normais de actividade do complexo IV em mitocôndrias isoladas de músculo (89 doentes) e em homogeneizado de músculo (145 casos) em função do modo de expressão da actividade enzimática.

Abreviaturas: Mit- mitocôndrias; Hom- homogeneizado; nmol/min/mg proteína, como *ratio* da actividade da citrato sintase – CS – e como *ratio* da actividade do complexo II da CRM; em todos os casos em função do v.r. (nmol; nmol/CS, nmol/II) e em % da média do v.r. (%med, %med/CS, %med/II).

Tabela 34 - Unidades de expressão da actividade do complexo IV - mitocôndrias de músculo.

MIT n=89	%med	nmol	%med/CS	nmol /CS	%méd/II	nmol / II
%med		,586	,327	,585	,266	,310
nmol			,555	,425	,472	,541
%med/CS				,276	,508	,413
nmol /CS					,219	,315
%méd/II						,482

Análise de concordância da actividade enzimática do complexo IV da CRM em termos de normalidade ou deficiência entre as várias unidades de expressão da mesma em mitocôndrias isoladas de músculo de 89 doentes.

Abreviaturas: %med - nmol/min/mg proteína em relação à média do v.r.; nmol - nmol/min/mg proteína em relação ao limite inferior do v.r.; %med / CS - função da citrato sintase (CS) em relação à média do v.r. (unidades usadas no estudo); nmol / CS - função da citrato sintase (CS) em relação ao limite inferior do v.r.; %méd / II- função do complexo II da CRM em relação à média do v.r.; nmol / II - função do complexo II da CRM em relação ao limite inferior do v.r.

Como descrito nos métodos, o grau de concordância é moderado para valores de coeficiente de concordância (*Kappa*) de 0.41 a 0.60 e total/ completa: 0.61 a 0.80.

Tabela 35 - Unidades de expressão da actividade do complexo IV - homogeneizado de músculo.

HOM n=145	%med	nmol	%med/CS	nmol /CS	%méd/II	nmol / II
%med		,848	,710	,628	,378	,558
nmol			,669	,530	,286	,494
%med/CS				,773	,425	,652
nmol /CS					,505	,603
%méd/II						,434

Análise de concordância da actividade enzimática do complexo IV da CRM em termos de normalidade ou deficiência entre as várias unidades de expressão da mesma em homogeneizado de músculo de 145 doentes.

Abreviaturas: %med - nmol/min/mg proteína em relação à média do v.r.; nmol - nmol/min/mg proteína em relação ao limite inferior do v.r.; %med / CS - função da citrato sintase (CS) em relação à média do v.r. (unidades usadas no estudo); nmol / CS - função da citrato sintase (CS) em relação ao limite inferior do v.r.; %méd / II- função do complexo II da CRM em relação à média do v.r.; nmol / II - função do complexo II da CRM em relação ao limite inferior do v.r.

Comparou-se o diagnóstico funcional de cada doente aplicando as diversas unidades de actividade enzimática. Na figura 74 está representada a percentagem das crianças que apresentaram valores superiores ao limite inferior do v.r. ou $\geq 30\%$ da média do v.r. com os diversos modos de expressar a actividade enzimática.

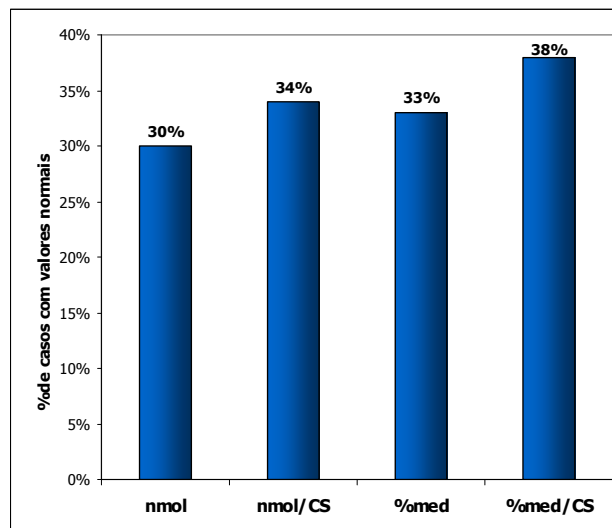


Figura 74 - Valores normais de actividade enzimática da CRM nas várias unidades.

Percentagem de crianças com valores normais de actividade enzimática em todos os complexos da CRM no conjunto dos tecidos estudados em 198 doentes, expressa nas várias unidades consideradas. Normal: superior ao limite inferior do v.r. ou a $\geq 30\%$ da média do v.r. Abreviaturas: nmol - nmol/min/mg proteína em relação ao limite inferior do v.r.; nmol / CS - função da citrato sintase (CS) em relação ao limite inferior do v.r.; %med - nmol/min/mg proteína em relação à média normal (isto é, do v.r.); %med / CS - função da citrato sintase (CS) em relação à média do v.r. (unidades usadas no estudo).

Com o objectivo de avaliar a relevância da *normalização* da actividade enzimática dos complexos da CRM para a citrato sintase, reviu-se a classificação diagnóstica dos casos com *défice isolado do complexo IV*, traduzindo aquela actividade sem a *correção* para a citrato sintase e aplicando os critérios já referidos

Nos 25 casos com *défice isolado do complexo IV*, quando a actividade foi traduzida nas unidades adoptadas (em percentagem da média do v.r. em função da citrato sintase) 14 tinham valores entre 20 e 30% e 11, valores abaixo de 20%. Na revisão, aqueles números passam a 6 e 17, respectivamente, sendo que em dois casos deixa de ser valorizado um *défice do complexo IV*. Deste modo, 13 mudaram (52%) e 12 mantiveram-se no mesmo escalão de critérios laboratoriais totais. Em consequência, 15 (60%) mantiveram o mesmo grau de certeza diagnóstica, dois passaram de definido a provável e oito de provável a definido. Assim, dos 25 doentes com *défice do complexo IV*, passaria a haver mais seis com o diagnóstico de DCRM definida.

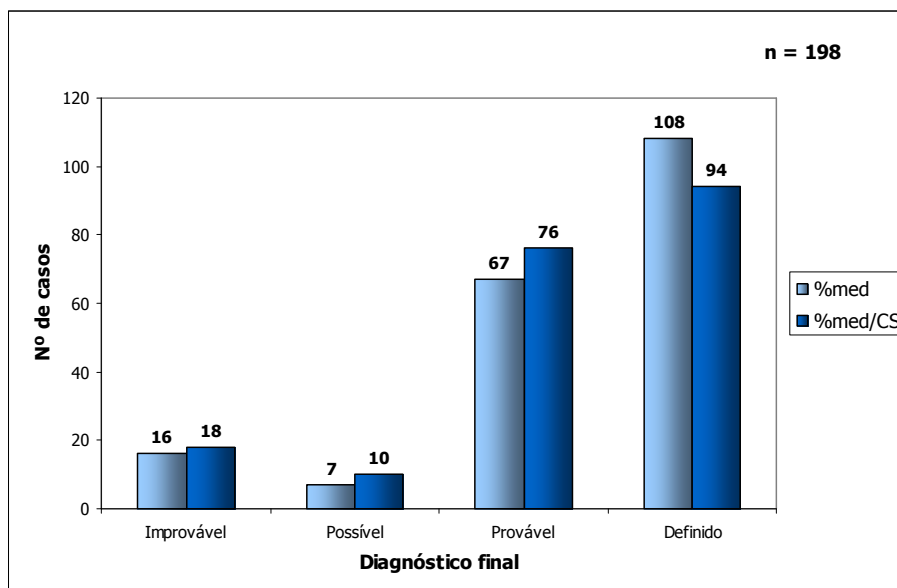


Figura 75 - Influência da *correção* para a citrato sintase no diagnóstico final em 198 doentes.

A *normalização* para a citrato sintase (CS) fez baixar o número de casos com diagnóstico de DCRM definida.

%média - percentagem da média do v.r.; %média/CS - percentagem da média do v.r. corrigido para a citrato sintase.

Aplicou-se o mesmo procedimento ao total dos 198 doentes com estudo espectrofotométrico da CRM e verificou-se concordância de resultados em 138 (70%), sendo que 139 (70%) se mantiveram no mesmo escalão de critérios laboratoriais totais. Cento e cinquenta e duas crianças (78%) conservaram o mesmo grau de certeza diagnóstica (figura 75, tabela 36). Em dois casos verificou-se uma discrepância de três níveis, tendo o diagnóstico passado de improvável a definido. A utilização das unidades

em percentagem da média do v.r. não corrigida para a citrato sintase fez aumentar de escalão diagnóstico 31 casos e baixar 15 e levou ao diagnóstico de DCRM definida em 55% dos 198 casos (contra 48% nas unidades adoptadas). O somatório dos diagnósticos de DCRM definida e provável é semelhante em ambos os casos (175 e 170) (tabela 36).

Tabela 36 - Influência da *normalização* para a citrato sintase no diagnóstico final em 198 doentes.

DCRM		% média				
		Improvável	Possível	Provável	Definido	Total
%média/CS	Improvável	14	0	2	2	18
	Possível	1	5	3	1	10
	Provável	1	1	51	23	76
	Definido	0	1	11	82	94
	Total	16	7	67	108	198

Em 78% dos casos (152 doentes) manteve-se o escalão de diagnóstico.

%média - percentagem da média em valor absoluto; %média/CS - percentagem da média corrigida para a citrato sintase (CS).

Quando se classificou os doentes com os critérios gerais de Nijmegen e o déficit funcional foi traduzido como inferior a 20% da média do v.r., inferior a 20% da média do v.r./ citrato sintase, inferior ao v.r. em nmol/min/mg e inferior ao v.r. em nmol/min/mg normalizado para a citrato sintase, atribuiu-se o diagnóstico de DCRM definida a 17%, 17%, 16% e 15% dos casos, respectivamente. A análise de concordância entre os níveis de diagnóstico (definido versus possível/improvável) e os valores da actividade enzimática (normais versus inferiores ao normal) traduzidos nas diferentes unidades mostrou valores de *Kappa* próximos de zero em todos os cruzamentos.

O equilíbrio entre a actividade dos complexos da CRM

Com o objectivo de valorizar o equilíbrio entre as actividades dos complexos da CRM seleccionou-se um subgrupo de 32 doentes com um quadro clínico muito sugestivo de DCRM, isto é, com compromisso de três ou quatro órgãos/sistemas, nos quais as actividades enzimáticas dos complexos I a V tinham sido normais. Neles avaliou-se a existência de um desequilíbrio da CRM através dos *ratios* entre as actividades enzimáticas dos vários complexos. Tratava-se de seis e de 26 doentes pontuados com quatro e três pontos na vertente clínica dos critérios gerais de Nijmegen e nos quais o estudo funcional da CRM no músculo (o único tecido estudado em todos os casos) tinha sido normal, segundo os critérios adoptados. Em seis casos havia desequilíbrio na CRM. Em dois deles a actividade enzimática dos complexos envolvidos (em nmol/min/mg de proteína) era anormal (diminuída num e aumentada noutro). Nos restantes, nos quais se

incluem um caso de LHON e um de síndrome de Pearson, os valores da actividade enzimática de todos os complexos eram normais (entre 30% e 156% da média do v.r.).

Valor diagnóstico dos segmentos I+III e II+III

No diagnóstico dos nossos doentes não foi tida em conta a actividade dos segmentos I+III e II+III da CRM, apesar da mesma ter sido avaliada em todos. Com o objectivo de investigar a relevância da avaliação daqueles segmentos no diagnóstico das DCRM, fez-se a correlação entre a actividade dos segmentos e a somatório dos respectivos complexos e revisão do diagnóstico final dos 198 doentes usando os défices dos segmentos I+III e II+III como critério de diagnóstico adicional.

Na figura 76 está resumida a correlação entre o défice funcional dos segmentos I+III e a deficiência dos complexos I e/ou III e o défice funcional do segmento II+III e a deficiência dos complexos II e/ou III. Na análise de concordância constatou-se valores de *Kappa* inferiores a 0,35 em todos os cruzamentos.

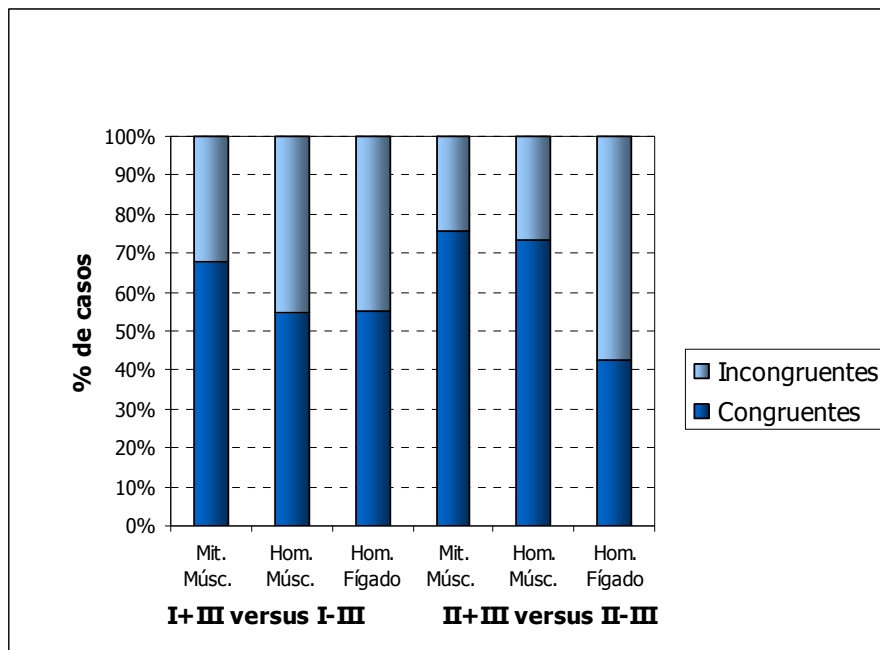


Figura 76 - Correlação entre os segmentos I+III e II+III e os respectivos complexos enzimáticos.

Correlação entre o défice funcional dos segmentos I+III e II+III e a deficiência dos complexos I e/ou III e II e/ou III em 89 amostras de mitocôndrias (Mit.) de músculo (Músc.), 145 amostras de homogeneizado (Hom.) de músculo congelado e 41 amostras de homogeneizado de fígado.

O valor de *Kappa* foi inferior a 0,35 em todas as análises, o que indica um grau concordância baixo ou muito baixo.

Em 24% (5/21) e em 30% (12/40) dos casos com défice do complexo II e do complexo III, respectivamente, constatou-se défice do segmento II+III. Vinte e seis por cento

(18/48) dos doentes com actividade diminuída do complexo I e 60% (24/40) dos casos com défice do III apresentaram diminuição da actividade do segmento I+III.

Na revisão do diagnóstico final usando os défices dos referidos segmentos como critério de diagnóstico adicional, verificou-se que em cinco casos, o critério funcional passaria de *minor* a *major*, em quatro de nenhum a *minor* e num caso de nenhum a *major*. Neste contexto, em cinco doentes haveria alteração da classe diagnóstica (de provável para definida).

Os défices simultâneos dos segmentos I+III e II+III têm sido referidos como indicadores de défice de CoQ. Em 10 crianças desta série havia valores inferiores a 30% da média/ citrato sintase simultaneamente nos segmentos I+III e II+III. Todas apresentaram igualmente défice de um ou vários dos complexos I-V da CRM, sendo que em oito havia défice do complexo III, isolado ou em associação.

Os complexos III e V em homogeneizado de tecido congelado

Analisou-se o contributo diagnóstico dos resultados do estudo da actividade enzimática dos complexos III e V da CRM determinada em tecidos congelados na série de doentes. A utilização de amostras congeladas de tecidos para a avaliação da actividade daqueles complexos da CRM tem sido questionada por alguns investigadores (Rustin et al, 1994; Thorburn et al, 2004a).

A actividade do complexo III da CRM foi determinada em homogeneizado de músculo, fígado e/ou miocárdio congelados em 144, 40 e 11 crianças respectivamente. Os valores eram normais em 89, 30 e seis casos respectivamente. A actividade do complexo III foi determinada em mitocôndrias isoladas de músculo em 89 casos, tendo sido normal em 39.

Em 43 crianças o estudo do complexo III foi feito em mitocôndrias e no homogeneizado congelado da mesma amostra de músculo, apresentando resultados concordantes em 41 casos (95%).

Quatro doentes apresentaram como único critério laboratorial *major* um défice do complexo III em músculo, facto que foi decisivo para a sua inclusão no grupo das DCRM definidas. Dois destes, nos quais o homogeneizado de músculo congelado foi o único tecido estudado, passariam a ser considerados DCRM provável num caso e possível no outro se não tivesse sido tido em conta o estudo em amostra de tecido congelado.

O complexo V da CRM foi determinado em homogeneizado de músculo, fígado e/ou miocárdio congelados em 145, 41 e 11 crianças respectivamente. A actividade do complexo V foi normal em 124, 26 e 7 doentes, respectivamente. O estudo do complexo V foi feito em mitocôndrias isoladas de músculo em 86 casos, 66 dos quais tinham valores normais.

Nas 52 crianças em que foi feita a determinação da actividade do complexo V da CRM simultaneamente nas mitocôndrias e no homogeneizado de músculo congelado, os valores foram coincidentes em 79% (41 casos).

Quatro crianças apresentaram défice *major* isolado do complexo V, o que foi determinante para a sua classificação como DCRM definida. Em todos os casos, o músculo foi o único tecido estudado: em dois, o défice verificou-se nas mitocôndrias mas não no homogeneizado congelado; nos outros dois, verificou-se défice *major* no homogeneizado de músculo congelado, não tendo sido avaliadas as mitocôndrias. Se se tivesse optado por não valorizar o resultado da avaliação do complexo V em tecidos congelados, estes dois doentes mudariam de grupo diagnóstico de definido a provável. Neste contexto, um outro doente, com défice *minor* do complexo V em homogeneizado de músculo, passaria de provável a possível

Análise funcional de mitocôndrias isoladas de músculo

Em 89 doentes a análise funcional da CRM incluiu mitocôndrias isoladas de músculo. O estudo do músculo limitou-se às mitocôndrias isoladas em 48 casos.

Comparou-se em 70 doentes os resultados do consumo de oxigénio em mitocôndrias isoladas de músculo com a actividade espectrofotométrica dos complexos ou segmentos da CRM *correspondentes*. Verificou-se valores concordantes entre os resultados da polarografia e os da espectrofotometria (actividades expressas em percentagem da média do v.r.) em 60%, 50% e 36% dos casos, usando como substratos o malato-piruvato, o succinato e o duroquinol, respectivamente. A análise de concordância foi negativa em todos os cruzamentos (*Kappa* 0,136; 0,027 e 0,030, respectivamente).

A actividade enzimática do complexo IV da CRM foi quantificada no homogeneizado inicial (isto é, antes do isolamento das mitocôndrias), nas mitocôndrias isoladas e no homogeneizado de músculo congelado, em 41 amostras de músculo. Aquela actividade, em função da citrato sintase, foi inferior a 30% da média do v.r. em 17 (58,5%) dos homogeneizados iniciais, 8 (20%) dos preparados de mitocôndrias isoladas e 9 (22%) dos homogeneizados de tecido congelado. Em 23 (56%) amostras de músculo houve concordância nos resultados obtidos pelos três modos de avaliar o complexo IV: normal em 20 e deficiente em três casos (figura 77).

Em 28 (68%), 29 (71%) e 30 (73%) dos 41 casos havia conformidade em termos da existência de défice da CRM entre os resultados do homogeneizado inicial versus mitocôndrias, do homogeneizado inicial versus homogeneizado de músculo congelado e das mitocôndrias versus homogeneizado de músculo congelado, respectivamente. A análise de concordância foi baixa ou muito baixa (*Kappa* inferior a 0,36) em todos os casos.

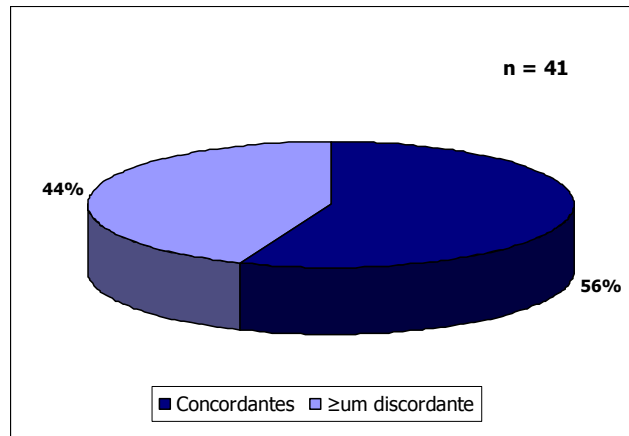


Figura 77 - Actividade do complexo IV em três preparações de músculo de 41 doentes.

Actividade do complexo IV no músculo em 41 doentes: comparação entre o homogeneizado inicial, as mitocôndrias isoladas e o homogeneizado de músculo congelado. Em 56% dos casos houve concordância entre os resultados obtidos pelos três diferentes métodos de análise.

A actividade enzimática da CRM em linfócitos

O estudo mitocondrial espectrofotométrico da actividade dos complexos II, III e IV em linfócitos do sangue periférico foi realizado em 90 doentes na primeira metade do período de estudo. Não faz parte dos critérios de diagnóstico de DCRM de Bernier, pelo que não foi analisado naquele contexto.

Vinte e oito das 90 (31%) crianças, apresentaram défice (inferior a 30% da média do v.r. em função da citrato sintase) de pelo menos um dos complexos em linfócitos (figura 78): défice do complexo IV em 16, do III em 10 e generalizado (II, III e IV) em dois doentes. Em 10 casos (11%) constatou-se défices maiores nas unidades adoptadas, todos do complexo IV.

Os 90 doentes com análise espectrofotométrica em linfócitos fizeram igualmente estudo em amostra de músculo (figura 78). Apresentaram défice (inferior a 30% da média/citrato sintase) dos complexos II, III e/ou IV em 47 casos (52%) em amostra de músculo esquelético [em 32 das 51 preparações mitocondriais (63%) e em 23 dos 61 homogeneizados de músculo (37%)].

Em quatro dos dez casos com défice *major* do complexo IV em linfócitos, aquela actividade era normal no músculo.

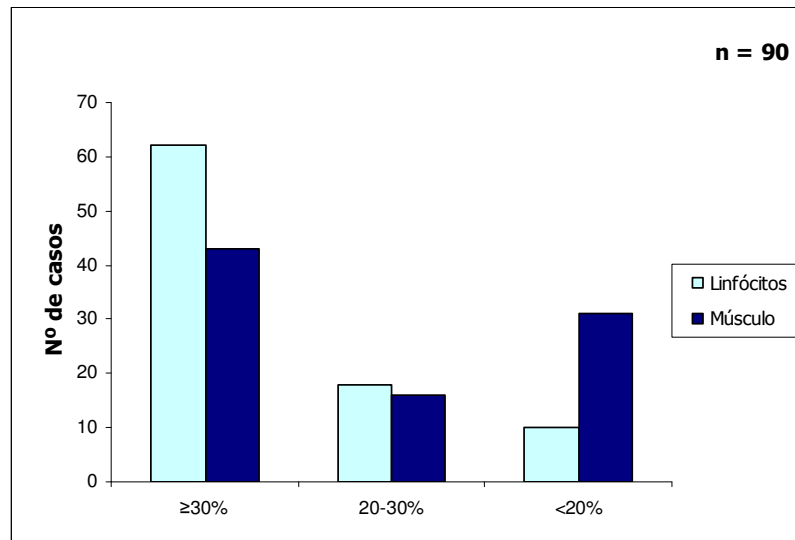


Figura 78 - Actividade dos complexos II a IV em linfócitos e no músculo em 90 doentes.

Actividade dos complexos II a IV (percentagem da média do v.r. normalizada para a citrato sintase) em linfócitos e no músculo e sua relação em 90 doentes. Foi considerado o valor mais baixo em qualquer dos complexos e em qualquer das preparações musculares.

Os complexos II, III e IV determinados em linfócitos e em músculo do mesmo doente estavam alterados no mesmo sentido (normais ou deficitários) em ambas as preparações em 41 dos 90 casos (46%) (23/51: 45% para as mitocôndrias e 27/61: 44% para o homogeneizado. Não se verificou concordância entre as actividades dos complexos II, III e IV (isoladamente ou no seu conjunto) em linfócitos e em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético, homogeneizado de músculo ou fígado ou no somatório dos tecidos estudados ($Kappa < 0,5$ em todas as comparações).

A actividade do complexo IV foi determinada em linfócitos em 22 das 41 crianças que tiveram o complexo IV avaliado em homogeneizado fresco, em homogeneizado congelado e em mitocôndrias isoladas da mesma preparação de músculo, com resultados concordantes em 50%, 55% e 68% dos casos, respectivamente.

Se o estudo funcional em linfócitos tivesse sido usado como critério de diagnóstico a par dos outros tecidos, teria feito variar o critério funcional em 12 doentes. Seis manteriam o mesmo grau de diagnóstico e os outros seis passariam a um grau superior, sendo que quatro seriam novos casos de DCRM definida.

CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Com o objectivo de tornar a discussão deste trabalho mais compreensível, optou-se por abordar inicialmente os principais pontos referentes à metodologia e resultados (a selecção clínico-laboratorial dos doentes e a abordagem diagnóstica da mitocôndria). Segue-se uma reflexão sobre o diagnóstico atribuído aos 200 doentes (os critérios adoptados, as características dos doentes com DCRM definida e dos casos de DCRM secundária, bem como possíveis factores de interferência com o diagnóstico final). Por fim, faz-se uma reflexão sobre a incidência e a prevalência das DCRM com início na primeira década de vida, na Região Centro de Portugal

6.1 Metodologia e resultados

6.1.1 Selecção clínico-laboratorial dos doentes

A amostra objecto da actual revisão é o grupo das crianças investigadas no HP por suspeita de DCRM com recurso ao estudo de tecidos (músculo, fígado e/ou miocárdio), entre 1997 e 2006. Este período corresponde à primeira década de implantação da investigação diagnóstica das DCRM no HP.

Na prática clínica pediátrica é frequente atribuir-se uma possível causa metabólica, nomeadamente um défice da CRM, a quadros clínicos complexos e/ou graves de etiologia não esclarecida. As DCRM são das doenças hereditárias do metabolismo mais frequentes (Thorburn, 2004). No entanto, a designação e o âmbito do conceito de DCRM variam conforme os grupos que se dedicam a estas patologias: doenças mitocondriais, citopatias mitocondriais ou doenças da fosforilação oxidativa (Munnich et al., 1996; Smeitink et al., 2001; DiMauro e Schon, 2006). Não se trata de uma entidade nosológica, mas de um vasto grupo de doenças que têm em comum um défice primário da fosforilação oxidativa, sendo a sua classificação difícil (Naviaux, 2004). São patologias proteiformes, de apresentação clínica muito variada, colocando importantes questões de diagnóstico diferencial com uma grande variedade de outras doenças. Podem atingir um ou mais órgãos ou sistemas, de modo aparentemente aleatório e habitualmente progressivo, sobretudo na criança (Munnich, 2006).

A abordagem diagnóstica das DCRM não é consensual e não existe uma prova simples, de aplicação rápida e interpretação inequívoca que nos confirme ou exclua a hipótese. Uma amostra de sangue periférico pode permitir em alguns casos, perante um quadro clínico típico, sindromático, ou no enquadramento de doença familiar já conhecida, detectar uma mutação do mtDNA ou do nDNA e estabelecer o diagnóstico. No entanto, esta situação, relativamente frequente no adulto, é rara na criança. Nesta, o diagnóstico

passa pelo estudo em biópsia de tecidos na maior parte dos casos (Rustin et al., 1994; Thorburn et al., 2004a; Janssen et al., 2006a). A realização de uma biópsia tecidual, nomeadamente do músculo esquelético, é habitualmente decidida após muita ponderação e na posse de fortes argumentos clínico-laboratoriais, uma vez que, na criança, é um acto cirúrgico com anestesia geral.

A selecção dos doentes com investigação da CRM em tecidos extra-sanguíneos excluiu desta análise muitos outros casos, porventura mais numerosos, em que o estudo se limitou, no período do estudo, ao sangue periférico. Não surpreende pois que o grupo seleccionado apresente manifestações clínicas graves e que se tenha obtido uma elevada taxa de confirmação diagnóstica.

Realizou-se a investigação de 20 doentes por ano em média. Em 2002 assistiu-se a um pico de 35 casos, 10 dos quais foram crianças autistas incluídas num estudo epidemiológico (Oliveira et al., 2005). É de prever que o número de doentes estudados por ano se mantenha ou reduza apenas ligeiramente. Os casos mais antigos, *acumulados* por falta de capacidade diagnóstica, foram já investigados, ocasionalmente em situação de agravamento com desfecho fatal. No entanto, a actual disponibilidade de ferramentas laboratoriais para o diagnóstico e o maior alerta para as DCRM tenderão a manter aquele número, embora à custa de um aumento dos casos sem diagnóstico, tal como se demonstrou na nossa série. O número de doentes com outros diagnósticos, embora muito variável ao longo do período de estudo, mostrou tendência a manter-se. Apesar de o ano de 2006 ter sido o segundo em número de casos com outros diagnósticos, admite-se que o alargamento do rastreio neonatal a um grupo maior de doenças hereditárias do metabolismo a partir de 2005 venha a fazer baixar o número de crianças com erros inatos do metabolismo que colocam problemas de diagnóstico diferencial com DCRM. No mesmo sentido, vai a melhoria da capacidade de diagnóstico e tratamento de infecções graves antes de ser colocada a hipótese de DCRM.

Apesar de não se dispor de dados relativos ao nosso País, a taxa de consanguinidade em primeiro grau das famílias investigadas (1,5%) não parece ser muito elevada. O número de famílias com história de mortes inesperadas em familiares próximos (tios, primos em primeiro grau e avós) é elevado, atingindo quase um quarto das mesmas. De notar ainda a precocidade daquelas mortes: mais de metade ocorreu nos primeiros dois anos de vida. A proporção de antecedentes patológicos relevantes nos progenitores (mais de um quarto) e nos familiares (mais de metade) é também elevada. O facto de as mães e dos familiares maternos serem os que mais contribuíram para esta morbilidade pode dever-se à circunstância de serem as mães as informantes habituais e, portanto, melhor conhecedoras do *seu lado* da história familiar. É excessivo interpretá-lo como uma maior real incidência de patologia na linha materna na suspeita de DCRM, patologias em que é

paradigmática, embora rara na criança, a hereditariedade materna (DiMauro e Schon, 2006).

As DCRM são de um modo geral clinicamente graves na criança, levando frequentemente à decisão de não ter mais filhos. É assim compreensível que, apesar de quase metade (46%) dos doentes ser o primeiro filho do casal, cerca de um terço das crianças (31%) fossem ainda filhos únicos na altura do estudo. A incidência de gravidez de risco por morte pré-natal anterior (6%) e/ou complicada (27%), de prematuridade (15%), de parto distócico (39%) e de asfixia perinatal (10%) é elevada, o que está de acordo com a gravidade dos quadros clínicos.

As alterações do foro NM, presentes em aproximadamente três quartos dos nossos doentes, foram as que mais frequentemente levaram à suspeita de DCRM, como é habitual nestas patologias (Zeviani et al., 1996; Finsterer, 2006). O início ENM, verificado em 24% das crianças desta série, ocorre mais frequentemente em idade pediátrica, chegando a ultrapassar 50% dos casos na experiência de alguns grupos (Munnich et al., 1996).

As circunstâncias da realização de estudos mitocondriais nos nossos doentes foram diversas. Na maior parte dos casos, a biópsia foi programada e ocasionalmente incluída no mesmo tempo anestésico de outro acto cirúrgico. Em cerca de um quarto das crianças, a decisão de colher tecidos para estudos mitocondriais decorreu directamente do mau prognóstico vital e da ausência de um diagnóstico etiológico seguro à época. Em aproximadamente metade daqueles doentes foram realizadas colheitas de tecidos *post mortem*, nas primeiras três horas após o falecimento, como é recomendado (Janssen et al., 2006a). Todas as amostras de miocárdio foram colhidas nestas circunstâncias. A primeira biópsia miocárdica foi realizada no HP apenas no final de 2006 num doente não sujeito a estudo mitocondrial.

De um modo geral, os resultados da investigação *post mortem*, incluindo os da autópsia, são demorados. Por outro lado, os estudos microbiológicos, nomeadamente virais, só nos últimos anos vão tendo uma resposta adequada. Este facto, associado à opção de se realizar estudos mitocondriais em músculo fresco ou com tempo de congelamento muito curto, levou a que fosse feita investigação funcional da CRM que de outro modo não seria eventualmente realizada. Tal atitude terá contribuído para a constatada tendência à diminuição do número de diagnósticos de DCRM ao longo do período de estudo, embora sem tradução em maior taxa de outros diagnósticos etiológicos.

Quase todas as crianças (97%) manifestaram a doença nos primeiros cinco anos de vida, sobretudo no primeiro ano de vida (71% dos casos) e principalmente no período neonatal (35% dos casos). Este perfil está de acordo com o que ocorre nas doenças hereditárias do metabolismo de um modo geral, constituindo o nascimento e o

crescimento acelerado dos primeiros anos de vida importantes factores que fazem revelar défices enzimáticos subjacentes. O mesmo perfil temporal tem sido referido para as DCRM pediátricas em particular (Saudubray et al, 2006; Rubio-Gozalbo et al., 2000a; Gibson et al., 2008). Segundo Naviaux, 20% das DCRM manifestam-se clinicamente antes dos 2 anos e 50% antes dos 5 anos de vida (Naviaux, 2004). Os dados publicados por Skladal permitem inferir que cerca de metade dos casos se apresentam antes dos 16 anos de idade (Skladal et al., 2003).

A elevada percentagem (25%) de crianças com manifestações pré-natais na nossa amostra é demonstrativa da gravidade dos quadros clínicos dos doentes investigados. Nas DCRM têm sido descritos sinais e sintomas pré-natais do mesmo tipo das verificadas neste grupo de doentes, nomeadamente restrição de crescimento intra-uterino, prematuridade e malformações (Cormier-Daire et al., 1996; von Kleist-Retzow et al., 2003; Saada et al., 2007; Gibson et al., 2008).

O envolvimento do SNC, no início (75% dos doentes) ou durante a evolução (92% dos casos), foi muito frequente neste grupo de crianças, como é típico das doenças hereditárias do metabolismo e em particular das DCRM. Quando há envolvimento multissistémico coloca-se mais prontamente a hipótese de DCRM. As formas limitadas a um órgão ou sistema, como o fígado, o miocárdio ou mesmo o SNC, durante uma boa parte ou toda a evolução, também representadas na nossa série, são as que levantam maior dificuldade diagnóstica (Munnich, 2006).

O atraso do neurodesenvolvimento, que atinge cerca de 10% da população pediátrica geral (Capute e Accardo, 1991), foi extremamente frequente e grave na nossa série, atingindo 81% das 191 crianças que sobreviveram após a primeira semana de doença: atraso severo ou profundo em quase metade (45%), com regressão em aproximadamente um quinto (18%) das 191 crianças. A escala de avaliação mais usada (*Schedule of Growing Skills II*) é um teste de rastreio que não permite uma tradução quantitativa do desenvolvimento psicomotor em termos de quociente de desenvolvimento (QD) ou quociente de inteligência (QI). Fez-se por isso uma adaptação da escala de atraso mental da Sociedade Americana de Psiquiatria, aplicada retrospectivamente nesta amostra (*American Psychiatric Association*, 2002).

Sendo a epilepsia, a par do atraso do neurodesenvolvimento, uma das manifestações mais comuns de lesão neurológica na criança, não é de estranhar que mais de um terço dos nossos doentes (70 casos) tenha apresentado epilepsia, na maior parte dos casos associada a atraso e/ou regressão do neurodesenvolvimento. Optou-se pela classificação da Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 1989, por ser de mais fácil aplicação retrospectiva (Liga Portuguesa Contra a Epilepsia, 1996). O carácter evolutivo da epilepsia em muitos dos doentes tornou particularmente difícil a sua catalogação.

As DCRM têm sido referidas como estando associadas a epilepsia, sem que haja no entanto um tipo de epilepsia característico (Khurana et al., 2008; Lee et al., 2008). A

síndrome de Alpers, que junta epilepsia refractária, degeneração cerebral difusa e cirrose hepática, é actualmente considerada uma DCRM, frequentemente causada por mutações no gene *POLG1* (Naviaux e Nguyen, 2004; Davidzon et al., 2005; Gordon, 2006). Na nossa série, apesar de oito doentes associarem epilepsia e citólise (seis) ou insuficiência de síntese hepática (dois), nenhum apresentou um quadro clínico sugestivo de síndrome de Alpers, pelo que não foi na altura quantificado o mtDNA, nem investigado o gene *POLG1*. Estes casos estão a ser reavaliados, uma vez que o envolvimento hepático na síndrome de Alpers poderá surgir apenas no decurso da evolução e por outro lado o espectro clínico associado a mutações do gene *POLG1* é muito variado, incluindo encefalopatia inespecífica com ou sem envolvimento multissistémico (Horvath et al., 2006; Kollberg et al., 2006).

As DCRM constituem uma possível causa de síndrome de West (Shah et al., 2002; Blanco-Barca et al., 2004). Esta foi diagnosticada em sete crianças da nossa série, três das quais com DCRM definida primária (Silva et al., 2008). A associação de atraso e/ou regressão do neurodesenvolvimento à epilepsia, que configurou em diversos casos o quadro de encefalopatia epiléptica, traduz a gravidade do atingimento neurológico neste grupo.

As alterações do movimento, identificadas num quinto (40) das nossas crianças e que têm sido descritas nas DCRM, são das manifestações que colocam maiores problemas de diagnóstico diferencial (Garcia-Cazorla et al., 2008).

De acordo com a história natural das DCRM, a suspeita diagnóstica é reforçada quando durante a evolução vão sendo envolvidos outros órgãos (Munnich, 2006), o que aconteceu em quase um quarto dos nossos doentes.

A gravidade dos quadros clínicos das crianças deste estudo ficou bem espelhada na elevada mortalidade (27%) e no agravamento clínico de um número significativo (13%) de casos.

A importância dos sinais e sintomas apresentados levou a uma extensa investigação com vista à adequada caracterização clínico-laboratorial e ao diagnóstico diferencial. Embora não tenha havido propriamente *um protocolo* de investigação, o rastreio de envolvimento multiorgânico foi feito na generalidade dos doentes. Aquele rastreio e a investigação de outras etiologias, ditadas pelas exigências do diagnóstico diferencial em cada caso, foram realizados de um modo faseado. O primeiro seguiu as recomendações de Munnich (Munnich et al., 2001). O segundo foi *talhado* individualmente. Os diagnósticos diferenciais rastreados foram muito variados e compreenderam cromossomopatias, alteração da função tireoideia, infecções, aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, défices do ciclo da ureia, doenças lisossómicas, doenças dos peroxissomas, doenças da glicosilação das proteínas e defeitos da síntese ou transporte da creatina, entre outros.

A avaliação do possível envolvimento multissistêmico e a exclusão de outras doenças generalizadas, nomeadamente cromossomopatias e défices da glicosilação das proteínas fez-se antes da biópsia programada na maior parte dos casos. No entanto, em três dos nossos doentes, o diagnóstico de cromossomopatia foi confirmado só após o estudo mitocondrial, pela repetição do estudo do cariótipo após um período de vários anos, graças à evolução das técnicas de citogenética. Curiosamente numa dessas crianças havia critérios de DCRM definida. O rastreio das doenças da glicosilação através da determinação da transferrina deficiente em carboidratos, que só esteve disponível na segunda metade do período de estudo, deve ser realizado para diagnóstico diferencial na generalidade dos casos. A deficiente glicosilação proteica pode estar na origem de défices secundários da CRM (Briones et al., 2001), tal como se verificou nas duas crianças da nossa série com aquele diagnóstico, que cumpriam critérios de DCRM definida.

A decisão de submeter um doente a uma anestesia para biópsia diagnóstica é complexa, já que o risco anestésico pode ser acrescido nestes casos. No entanto é possível fazê-la com segurança mesmo em crianças com acidose láctica (Driessen et al., 2007). Nos nossos doentes e sempre que possível, foi aproveitado o tempo anestésico de outras cirurgias necessárias ao doente para a realização simultânea da biópsia muscular. O grupo de Nijmegen estabeleceu um *índice de probabilidade* (baseado em vários parâmetros, como a idade, a lactacidémia, a relação lactato/piruvato e a alaninémia, entre outros) da positividade da biópsia para orientar a sua indicação (Rubio-Gozalbo et al., 2000b). Mais recentemente, o mesmo grupo apresentou o somatório dos critérios clínicos e metabólicos/imagiológicos da vertente dos *critérios gerais* da sua escala de diagnóstico de DCRM como orientador da indicação da biópsia para estudos mitocondriais em crianças. (Morava et al, 2006b).

O desfecho fatal de uma proporção significativa de casos na nossa série (26,5%) levou à realização de colheitas *post mortem*, sempre que possível, mesmo em alguns doentes previamente investigados.

6.1.2 Abordagem laboratorial da mitocôndria

As mitocôndrias são organelos muito heterogéneos que mudam de forma e de localização dentro da célula de acordo com a sua actividade funcional (Kunz, 2003; Tieu e Przedborski, 2006). A CRM tem algumas particularidades que tornam singularmente difícil o estudo diagnóstico das DCRM: uma dupla regulação genética (de que decorrem a heteroplasmia, o efeito limiar e a variabilidade tecidual) e uma elevada actividade enzimática residual (Thorburn e Smeitink, 2001).

Dada a complexidade da etapa final comum da produção de energia, não existe uma abordagem laboratorial única para estudar a CRM. Os métodos existentes são de um modo geral complexos, com protocolos diversos e resultados de interpretação difícil,

frequentemente do âmbito da investigação básica e/ou clínica. O leque da investigação laboratorial é muito amplo, indo de estudos histológicos até análises de genética molecular e passando por estudos bioquímicos muito variados, com destaque para a enzimologia, de uso generalizado (Coenen et al., 1999; Hanson et al., 2002; Setterfield et al. 2002; Cossarizza, 2003; McKenzie et al., 2007).

Subdividiu-se o estudo mitocondrial dos nossos doentes em avaliação global, indirecta, da função mitocondrial e análise específica da actividade da CRM. Os resultados de ambos podem estar alterados por um défice primário da CRM ou secundariamente por outras patologias (Chrétien e Rustin, 2003; Thorburn et al., 2004a). A avaliação funcional foi complementada pelo rastreio das mutações e deleções mais frequentes do mtDNA em todos os doentes e do nDNA em casos seleccionados.

Com o estudo destes doentes contribuiu-se para que os métodos de abordagem da função da CRM com fins diagnósticos fossem implementados e desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Genética do CNC.

A hiperlactacidémia, critério laboratorial *minor* de DCRM, foi demonstrada em cerca de três quartos dos nossos doentes. É no entanto bem conhecido que uma lactacidémia normal, mesmo quando não explicada por perda tubular proximal renal de lactato, não exclui uma DCRM (Poggi-Travert et al., 1996; Niaudet, 1998). A valorização da hiperlactacidémia como indicador de DCRM é problemática, já que o diagnóstico diferencial é vasto e a sua determinação está sujeita a várias fontes de erro, nomeadamente as decorrentes das condições de colheita e transporte de amostras (Chariot et al., 1994). No final dos anos 90 estabeleceram-se os v.r. do lactato, piruvato e corpos cetónicos no plasma em crianças, nas condições de colheita, transporte e processamento das amostras no HP (Diogo et al., 1999).

O ácido láctico, subproduto da glicólise anaeróbia, acumula-se em variadíssimas condições, nomeadamente hipoxia tecidual de qualquer origem, DCRM e outros estados mórbidos que alterem a homeostase mitocondrial, como acontece em alguns erros inatos do metabolismo e muitas outras doenças genéticas ou adquiridas (Poggi-Travert et al., 1996; Duke, 1999; Kang et al., 2001; Saraiva et al., 2003; Thorburn et al., 2004a; Saudubray et al., 2006). As doenças hereditárias do metabolismo, nomeadamente as DCRM, não são, de facto, a causa mais frequente de hiperlactacidémia, tal como documentou Zeviani numa série de 125 crianças com hiperlactacidémia, em que apenas 60 tiveram o diagnóstico de doença hereditária do metabolismo, 42 das quais, o de DCRM (Zeviani et al., 1996).

A disfunção da CRM leva à acumulação de lactato e de corpos cetónicos e ao aumento dos quocientes lactato/ piruvato e β -hidroxibutirato/ acetoacetato. A elevação destes *ratios* traduz a alteração do estado *redox* pela acumulação de coenzimas reduzidos (NADH e FADH₂), ao nível citosólico (lactato/ piruvato) e mitocondrial (β -hidroxibutirato/

acetoacetato). O normal aumento da lactacidémia pós-prandial é nestes casos exacerbado, podendo assistir-se a uma elevação paradoxal da cetonémia no período pós-absortivo, quando mais NAD^+ é requerido para a catabolização adequada dos substratos glicolíticos. O quociente lactato/ piruvato era superior a 20 em 82% das 89 crianças com hiperlactacidémia nas quais foi determinado o piruvato no plasma. A elevação da relação lactato/ piruvato apontaria para uma deficiência da CRM, distinguindo-a dos defeitos da piruvato-desidrogenase, sendo que o poder discriminativo daquele quociente é maior para valores de lactato mais elevados (Debray et al., 2007a). No entanto, não há unanimidade em relação ao limite inferior do normal para aquele quociente, variando entre 18 e 25 conforme os laboratórios (Poggi-Travert et al., 1996; Smeitink et al., 2003). No único caso de défice da piruvato-desidrogenase desta série documentou-se acidose láctica, com relação lactato/piruvato entre 20 e 25, tanto no plasma como no *líquor*.

No que se refere a valores da lactacidémia, não se demonstrou na nossa série diferença estatisticamente significativa entre os grupos de DCRM definida primária e secundária. Do ponto de vista fisiopatológico, a hipoxia é semelhante a um défice terminal da CRM. A intensidade da hiperlactacidémia e o *ratio* lactato/piruvato não são discriminativos quanto ao carácter primário ou secundário do défice. Segundo Poggi-Travert (Poggi-Travert et al., 1996), a presença de cetose contribuiria para o diagnóstico diferencial entre doenças hereditárias do metabolismo energético e a hiperlactacidémia por hipoxia tecidual, onde a cetose está habitualmente ausente. Na nossa amostra não foi possível analisar a relação estatística entre os níveis de corpos cetónicos nos dois grupos de crianças (com DCRM primária e secundária), uma vez que no subgrupo dos secundários a cetonémia foi determinada em apenas um dos 17 casos.

Tendo em conta a valorização diagnóstica da persistência da hiperlactacidémia, subdividiu-se a nossa amostra em cinco grupos para análise (lactato normal em menos de três determinações, normal em três ou mais, elevado em menos de três, elevado em três ou mais ocasiões e acidose láctica). A persistência de valores elevados de lactato no plasma em várias determinações (verificada em cerca de metade dos doentes) e a associação da hiperlactacidémia com elevação da alanina e/ou prolina (em 40 de 134 doentes com hiperlactacidémia) têm sido considerados indicadores de disfunção da CRM (Bernier et al., 2002; Wolf e Smeitink, 2002). A presença de alaninémia normal diferenciaria mesmo a acidose láctica neonatal transitória de uma doença hereditária do metabolismo energético (Morava et al., 2006a). A associação entre hiperlactacidémia e hiperprolinémia dever-se-ia à inibição pelo lactato da síntese de citrulina e arginina a partir da prolina, demonstrada em enterócitos de porco (Dillon et al., 1999).

A lactacidémia varia com as refeições e o seu tipo, com a sobregarga de glicose e com o exercício físico (Chi et al., 1992; Poggi-Travert et al., 1996; Argov, 1998). Nos doentes da nossa série, as colheitas foram frequentemente aleatórias em relação às refeições.

Num estudo prospectivo do grupo de Nijmegen, a hiperlactacidemia em jejum e após teste de tolerância à glicose oral (mas não em pós-prandial) foi discriminativa em relação à existência de déficit da função oxidativa em biópsia de músculo (Rubio-Gozalbo et al., 2000b). Segundo os autores, a falta de padronização do intervalo de tempo até à colheita ou do teor e/ou tipo de hidratos de carbono da refeição poderia justificar aquele resultado.

Em 93 dos nossos doentes o lactato do plasma e do *líquor* foram determinados simultaneamente, mostrando valores normais ou elevados em ambos os fluidos biológicos em 20 e 24 casos respectivamente. O lactato do líquido cefalorraquídeo tem origem predominantemente na glicólise das células cerebrais, sendo que nestas a sua eliminação é mais lenta do que no sangue (Duke, 1999; Stacpoole et al., 1999). Vários autores (Boddaert et al., 2008; Rocha et al., 2008) recomendam que em doentes com envolvimento neurológico e lactacidemia normal se determine o lactato do *líquor* e/ou pesquise a existência de picos de lactato na ^1H RMS cerebral. Em dois dos nossos doentes havia hiperlactatorraquia com lactacidemia normal, o que reforça aquela recomendação. Inversamente, não haveria vantagem em dosear a lactatorraquia nos doentes com acidose láctica, no pressuposto de que estaria *passivamente* elevada (Poggi-Travert et al., 1996). De facto, a lactatorraquia era normal em apenas um de seis doentes com acidose láctica da nossa série em quem foi determinada.

O fígado é o principal responsável pela remoção do lactato e alanina circulantes através da neoglicogénese (Duke, 1999). Colocou-se por isso a hipótese de nos nossos doentes com insuficiência hepática haver maior frequência de hiperlactacidemia e de hiperalaninemia, o que não se verificou.

A quase totalidade dos nossos doentes com hiperalaninemia ou hiperprolinemia tinha hiperlactacidemia, atestando uma boa correlação entre aqueles parâmetros, como seria expectável. Verificou-se igualmente concordância entre os picos de lactato na espectroscopia e elevação do lactato ou da alanina plasmáticos. A ausência de correlação com a prolinemia pode dever-se à escassez do número de casos com hiperprolinemia submetidos a espectroscopia (três).

A bem estabelecida dependência da cetonemia com o jejum e a não padronização do horário das colheitas nas crianças desta amostra levou a que se analisasse o *ratio* entre a cetonemia e a concentração plasmática de ácidos gordos livres determinados simultaneamente. A acumulação de coenzimas reduzidas (NADH e FADH_2) devida ao bloqueio da CRM leva à inibição dos processos energéticos que dependem da sua reoxidação. Pode por isso haver aumento da cetogénese com predomínio do β -hidroxibutirato, por falta de escoamento hepático da acetil-CoA, pelo menos numa primeira fase. A acumulação das coenzimas reduzidas leva por sua vez à frenagem dos processos produtores de acetil-coA (nomeadamente a oxidação do piruvato e a β -oxidação dos ácidos gordos) e do ciclo de Krebs (Stryer, 1995). A esperada acumulação

de corpos cetónicos associada às DCRM com compromisso hepático não foi demonstrada nos nossos doentes, talvez por aquela frenagem ser significativa em doentes crónicos. A cetonémia relativa e o quociente β -hidroxibutirato/ acetoacetato não se correlacionaram com os défices enzimáticos da CRM, individualmente ou no seu conjunto, ao contrário do esperado. Na mesma linha, a cetonémia paradoxal seria um marcador importante das DCRM, já que o bloqueio se torna mais evidente após as refeições. Não foi no entanto demonstrada relação entre a elevação pós-prandial da cetonémia e os défices enzimáticos da CRM nos doentes estudados.

Avaliou-se ainda a possibilidade de a presença de cetose constituir um critério de diagnóstico de DCRM. Contudo, não foram detectadas diferenças com significado estatístico entre os grupos diagnósticos no que diz respeito à cetonémia relativa, à relação β -hidroxibutirato/ acetoacetato ou à presença de cetonémia paradoxal.

Nas DCRM podem ocorrer bloqueios secundários do ciclo de Krebs e da β -oxidação dos ácidos gordos, com consequente acidúria orgânica (intermediários do ciclo de Krebs e ácidos dicarboxílicos, respectivamente). Neste contexto, outra fonte possível de ácidos orgânicos é o esqueleto carbonado dos aminoácidos, cujo catabolismo mitocondrial pode ser afectado (Ueno et al., 2001; Yano et al., 2003). A cromatografia dos ácidos orgânicos urinários, realizada em pelo menos uma ocasião na maioria das crianças deste estudo, pode por um lado contribuir para o diagnóstico diferencial e por outro mostrar alterações devidas à disfunção da CRM. Para alguns investigadores, a presença de acidúria orgânica constitui critério de diagnóstico de DCRM (Hagenfeldt, 1998; Wolf e Smeitink, 2002). Assim, ao contrário do grupo de Bernier, que não usa os ácidos orgânicos como critério de diagnóstico, o grupo de Nijmegen atribui dois pontos na sua classificação diagnóstica à excreção urinária de lactato ou de intermediários do ciclo de Krebs e um ponto à dos ácidos etilmalónico, 3-metilglutacónico (metabolito do catabolismo mitocondrial da leucina) ou dicarboxílicos (Bernier et al., 2002; Wolf e Smeitink, 2002). Algumas variantes da acidúria 3-metilglutacónica têm sido associadas a DCRM, nomeadamente na associação MEGDEL e na síndrome de Barth e outras DCRM de origem nuclear (Barth et al., 2004; Wortmann et al., 2006). O ácido etilmalónico (que se acumula no *MADD* e na deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia curta) pode estar secundariamente elevado nas DCRM e inibe por sua vez a CRM (Garcia-Silva et al., 1994; Barschak et al., 2006). Na nossa amostra, a alteração mais frequente dos ácidos orgânicos urinários foi a excreção aumentada de lactato e/ou de intermediários do ciclo de Krebs e a acidúria dicarboxílica. Em nenhuma das crianças da nossa série (inclusive entre os rapazes com miocardiopatia) se demonstrou acidúria 3-metilglutacónica.

É impossível estabelecer em que medida a disfunção da CRM afecta os outros processos intramitocondriais e a própria CRM é por eles afectada, dificultando a interpretação dos estudos bioquímicos, em particular dos menos específicos.

O músculo foi o tecido investigado em mais de 95% das crianças da nossa série. Seguindo a escola francesa, optou-se pelo músculo deltóide e em alguns casos de colheitas *post mortem*, o músculo da parede abdominal (Touati et al., 2006). Alguns investigadores usam o quadricípete, nomeadamente o segmento vasto externo (Taylor et al., 2004; Janssen et al., 2006a).

O músculo estriado e o tecido encefálico são tecidos pós-mitóticos, isto é, com potencial de replicação muito reduzido e altamente dependentes de mitocôndrias intactas e funcionantes. Nestes tecidos, os défices funcionais da CRM devidos a alterações do mtDNA e/ou do nDNA vão-se agravando ao longo do tempo, sendo aí mais facilmente identificados. Por esse motivo, assim como pela sua acessibilidade, o músculo esquelético tem sido o tecido de eleição para o estudo da CRM, tanto no adulto como na criança (Rustin et al., 1994; Taylor et al., 2004; Thorburn et al., 2004b; Janssen et al., 2006a).

Em muitos casos justifica-se a avaliação de outros tecidos, como o fígado ou o miocárdio (este também pós-mitótico, mas de difícil acesso), mormente se clinicamente afectados. A investigação de amostras de órgãos afectados é fundamental para uma avaliação diagnóstica correcta, dada a possibilidade de ocorrência de défices específicos de tecidos (Rustin et al., 1993). O recurso ao estudo do fígado e outros tecidos como os fibroblastos é recomendado nos casos de forte suspeita clínica (mesmo com clínica de predomínio neurológico), em que a investigação do músculo esquelético tenha sido negativa (Edery et al. 1994; Panetta et al., 2005; Oglesbee et al., 2006). A análise do fígado foi realizada em mais de um quinto dos doentes desta amostra, sendo que em sete crianças que apresentaram clínica predominantemente hepática foi o único tecido investigado. As alterações graves da coagulação no contexto de insuficiência hepática dificultam a realização da biópsia, tal como se constatou na nossa experiência.

Fez-se a investigação funcional mitocondrial em linfócitos em quase metade dos doentes (90), principalmente na primeira metade do período do estudo. A pesquisa em linfócitos tem a vantagem da fácil acessibilidade e possibilidade de repetição da colheita. O carácter proliferativo do sangue e a heteroplasmia característica das alterações do mtDNA levariam a que os défices eventualmente detectados em outros tecidos pudessem não se traduzir nos linfócitos, o que constitui uma importante limitação ao seu uso diagnóstico nas DCRM (Thorburn et al., 2004a; Van den Heuvel et al., 2004). Este não é consensual, sendo opção para alguns investigadores (Rustin et al., 1994; De Wit et al., 2007), mas não para outros (Bernier et al., 2002; Wolf e Smeitink, 2002). Pode recorrer-se à cultura de linfócitos, tal como à dos fibroblastos da pele. Estes partilham muitas das limitações dos linfócitos como ferramenta de diagnóstico das DCRM (Van den Heuvel et al., 2004; Solaini et al., 2008). Dada a especificidade do estudo em linfócitos, o predomínio de alterações do nDNA na criança e a evolução dos estudos de genética molecular, pode vir a ser possível limitar a investigação ao sangue periférico em muitos dos doentes pediátricos.

A avaliação da produção global de energia a partir de substratos específicos como o piruvato, o malato, o succinato ou os ácidos gordos, entre outros, implica o uso de tecidos frescos, nomeadamente mitocôndrias isoladas ou homogeneizados de tecidos ou células. O tecido deve ser transportado para o laboratório num meio tampão próprio, a 4°C, em menos de três horas (Janssen et al., 2006a).

Neste contexto, a avaliação da síntese de ATP em linfócitos poderia constituir um teste de rastreio das DCRM (Marriage et al., 2003).

A avaliação do consumo de oxigénio com o eléctrodo de Clarke permite estimar o funcionamento global da CRM (Rustin et al., 1994; Sperl et al., 1997; Merlo-Pich et al., 2004). Apesar da necessidade de tecidos frescos e de condições técnicas difíceis de standardizar, muitos investigadores usam-na como instrumento diagnóstico, a par de outros (Rustin et al., 1994; Land et al., 2004).

No estudo dos nossos doentes foi usada a polarografia em linfócitos e em mitocôndrias isoladas de músculo. Devido aos constrangimentos acima referidos e ao facto de não se dispor de condições técnicas de obtenção de toda a informação possível da avaliação polarográfica, abandonou-se a sua realização sistemática para diagnóstico na segunda metade do período do estudo.

A vantagem da avaliação global de produção de energia mitocondrial é permitir a detecção de transtornos não atribuíveis directamente à CRM, como défice de substratos, de transportadores de catiões ou de adenilatos e défices da piruvato-desidrogenase, do ciclo de Krebs ou da β -oxidação dos ácidos gordos, condições que colocam questões de diagnóstico diferencial (Rustin et al., 1994). O grupo de Nijmegen concluiu que em quase um terço dos casos com suspeita de DCRM nos quais se comprovou uma deficiência da produção de energia não foi possível identificar défice na actividade específica de qualquer complexo da CRM ou da piruvato-desidrogenase (Wolf e Smeitink, 2002; Janssen et al., 2006a).

Os doseamentos da CoQ e do citocromo c, moléculas envolvidas no transporte de electrões entre os complexos da CRM, e o da cardiolipina, um fosfolípido da membrana interna da mitocôndria importante na sua funcionalidade, não foram efectuados em nenhum dos doentes em discussão. Numa menina com atraso do neurodesenvolvimento, epilepsia e síndrome nefrótica, que evoluiu com insuficiência renal crónica e miocardiopatia hipertrófica, está em curso o estudo da CoQ em fibroblastos. Nenhum dos sete doentes do sexo masculino com miocardiopatia, três dos quais entretanto falecidos, cursou com neutropenia ou acidúria 3-metilglutacónica, pelo que não foram na altura investigados para síndrome de Barth. Esta opção está a ser revista, uma vez nem sempre os doentes com síndrome de Barth apresentam quadros clínicos completos ou típicos (Spencer et al., 2006; Yen et al., 2008).

A quantificação da actividade enzimática dos complexos da CRM nos tecidos dos nossos doentes fez-se por espectrofotometria de duplo comprimento de onda, o que permitiu utilizar amostras de reduzidas dimensões, da ordem dos 20mg no caso do fígado e dos 100-200 mg no do músculo, mesmo quando se isolou mitocôndrias (Rustin et al., 1994). Foi assim possível utilizar uma quantidade muito reduzida de tecido, o que é particularmente relevante no caso de recém-nascidos e crianças pequenas. O volume de tecido disponível para análise pode, no entanto, ser um factor decisivo na fiabilidade dos resultados obtidos (Land et al., 2004).

Os défices da CRM mais frequentemente encontrados nas crianças da nossa série envolveram os complexos IV (em 89 casos) e I (em 68 casos). Estes resultados são concordantes com a experiência de outros grupos que relatam os complexos I e IV (por esta ordem) como os mais frequentes na criança (Smeitink et al., 2001a; Scaglia et al., 2004; Bohm et al., 2006). O défice do complexo IV (e não o do complexo I) é o predominante no nosso grupo de doentes, afectando 70% dos casos com DCRM definida primária, tal como se verificou no noroeste de Espanha (Castro-Gago et al., 2006). A especificidade genética do nosso grupo de doentes, eventualmente mais próxima da da população galega, podem estar na origem desta discrepância.

Os complexos enzimáticos da CRM têm particularidades que tornam a sua avaliação laboratorial especialmente difícil. Trata-se de proteínas de membrana, organizadas em complexos multienzimáticos, dependentes para o seu funcionamento de síntese, transporte e *assembling* adequados dos diferentes componentes. Por sua vez formam supercomplexos funcionalmente dependentes do meio, nomeadamente em termos de disponibilidade de cardiolipina, CoQ e citocromo c (Schägger e Pfeiffer, 2000).

Como já referido, e ao contrário das outras doenças hereditárias do metabolismo (incluindo as causadas por défice de outras enzimas mitocondriais como a acidémia metilmalónica) que cursam com níveis de actividade enzimática próximos do zero, as DCRM evoluem frequentemente com uma elevada actividade residual dos complexos da CRM. Esta pode mesmo ser normal nos tecidos acessíveis ao estudo (Mirabella et al., 2000; Thorburn e Smeitink, 2001; Chrétien e Rustin, 2003; Thorburn et al., 2004a). A criança com LHON e alterações neurológicas é disso um exemplo: o estudo espectrofotométrico da CRM em músculo, realizado em duas ocasiões ao longo da evolução, foi normal (Grazina et al., 2007).

A distribuição de valores normais da actividade enzimática da CRM não é gaussiana, não sendo possível estabelecer para as enzimas da CRM uma clara distinção entre valores normais e anormais: observa-se um contínuo, bem como uma enorme dispersão de valores (Bernier et al 2002; Chrétien e Rustin, 2003; Grazina, 2004; Thorburn et al., 2004b). Para ultrapassar esta dificuldade, alguns investigadores usam, não os valores absolutos da actividade enzimática, mas os seus *ratios*, conseguindo uma diminuição da

sua dispersão e a distinção entre normal e deficitário (Chrétien et al. 1998). Têm sido publicados vários métodos de ajustamento dos resultados da actividade enzimática da CRM, como a *normalização* para a citrato sintase (de que não se conhecem défices) ou para o complexo II (cujos défices são muito raros) (Rustin e Rotig, 2002; Grazina 2004; Thorburn et al., 2004b).

Uma questão relevante na avaliação da actividade enzimática da CRM prende-se com o teor em mitocôndrias do tecido estudado. O número e a funcionalidade das mitocôndrias são influenciados pelo meio intra e extracelular, de acordo com a célula e órgão em causa (Thorburn et al., 2004a). O exercício físico e a variação da massa muscular com ele relacionada influenciam a sua riqueza em mitocôndrias. Por outro lado, assiste-se a variações patológicas no número, forma e dimensões das mitocôndrias associadas ao défice da CRM, o que se traduz eventualmente na proliferação e acumulação de mitocôndrias anormais, que são o substrato patogénico das *RRF* (DiMauro e Morais, 1993). Esta questão torna-se ainda mais pertinente quando se faz o isolamento das mitocôndrias, já que há normalmente perda associada ao procedimento: a actividade do complexo IV nas mitocôndrias isoladas é de cerca de 30-40% a do homogeneizado inicial (Rustin et al., 1994). A *correção* das actividades dos complexos para uma enzima marcadora como a citrato sintase, o complexo II ou o IV, usada em muitos laboratórios, tem como objectivo eliminar a possível influência de alterações alheias à CRM propriamente dita, mormente a variação do número e qualidade das mitocôndrias da preparação (Janssen et al., 2006a; Wiedemann et al., 2000; Thorburn et al., 2004a). A citrato sintase em particular seria um bom índice do teor de mitocôndrias na preparação (DiMauro e Morais, 1993).

A obtenção de controlos *normais* é decisiva, sobretudo quando se trata de validar a actividade enzimática em músculo, que pode ser influenciada por factores como a idade, sexo, actividade física e estado de nutrição entre outros. A variabilidade da actividade da CRM com a idade e a necessidade de usar controlos normais para cada faixa etária tem sido objecto de controvérsia. O grupo de Melbourne demonstrou haver modificação da actividade da CRM no músculo em função da idade, sendo aquela actividade menor nas idades extremas: nas primeiras semanas de vida, pela influência da transição do meio relativamente anaeróbio do feto para o meio extra-uterino, aeróbio e no idoso, mais pela falta de uso do que pela acumulação de mutações do mtDNA associadas à idade (Kunz, 2003; Brierley et al., 1996). Já no fígado e no miocárdio não haveria esta variação com a idade (Thorburn et al., 2004a). Foi demonstrada a duplicação da actividade dos segmentos I+III e II+III ao longo dos primeiros três anos de vida, mas não da citrato sintase nem dos complexos II e IV (Majander et al., 1995). Outros investigadores não encontraram variação da actividade enzimática da CRM com a idade, quer aquela fosse traduzida em valor absoluto (nmol/min/mg proteína), quer como *ratio* entre os complexos da CRM (Chretien et al., 1998).

A eventual variação dos valores normais com o grupo muscular estudado é um outro factor a equacionar. Cada laboratório elegeu e estabeleceu valores normais para um determinado tipo de músculo, como o deltóide ou o vasto externo (Rustin et al., 1994; Janssen et al., 2000a). O recrutamento de controlos normais é frequentemente feito entre pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas de fracturas ou remoção de material de osteossíntese. Talvez por isso muitos grupos tenham optado pelo vasto externo, uma vez que as cirurgias dos membros inferiores são mais frequentes. Alternativamente, a utilização como v.r. dos dados obtidos em doentes cuja evolução veio a demonstrar que a hipótese de DCRM era pouco consistente poderá ser uma opção. Esta merece muitas reservas, atendendo à possibilidade de alterações da CRM secundárias a outras doenças (Chrétien e Rustin, 2003; Thorburn et al., 2004a). A crescente descrição de alterações enzimáticas secundárias da CRM associadas a défices primários de outras enzimas mitocondriais, incluindo as da própria CRM, torna ainda mais intrincada a valorização clínica dos resultados da actividade enzimática da CRM (van den Heuvel et al., 2004).

É conhecido que não há uma relação directa entre os dados obtidos de estudos funcionais globais, como o consumo de oxigénio e a síntese de ATP e a actividade enzimática da CRM (Wolf e Smeitink, 2002). Quando nos nossos doentes se correlacionou os resultados da análise polarográfica e espectrofotométrica que à partida avaliariam segmentos correspondentes da CRM, verificou-se ausência de concordância nos casos em que foi possível analisá-la estatisticamente [oxidação do duroquinol versus actividade do complexo III em linfócitos e oxidação do malato-piruvato, succinato e duroquinol versus complexos I, II e III, respectivamente, em mitocôndrias (valores expressos em percentagem da média do v.r.)]. Esta aparente discordância que tem sido referida por outros prende-se com a possível interferência das ROS na polarografia e a diferente sensibilidade dos métodos, polarográfico e espectrofotométrico (Land et al., 2004). Rustin (comunicação pessoal, 1994) demonstrou que é possível um consumo de oxigénio normal com défice da actividade do complexo IV até 50%.

É diverso o modo como os diferentes autores traduzem os resultados da actividade enzimática dos complexos da CRM: por mg de proteína ou g de tecido, em função do limite inferior do v.r. ou da média do v.r., com ou sem *normalização* para uma enzima marcadora, como a citrato sintase, o complexo II ou mesmo o IV (Zheng et al. 1990; Rustin et al. 1994; Morris et al. 1996; Bernier et al., 2002; Elpeleg et al., 2005; Enns et al., 2005; Oskoui et al., 2006). Por outro lado, mesmo quando se opta por apresentar os valores em percentagem da média do v.r. corrigido para a citrato sintase, também não há consenso. Ao rever o modo de expressão da actividade do complexo I em diferentes centros de diagnóstico, Thorburn concluiu que o limite inferior do v.r. variava entre 24 e 79% da média (Thorburn et al., 2004b). Valores anormais seriam os inferiores a 20% ou a 30% da média do v.r., utilizados respectivamente como critério *major* e *minor* de

diagnóstico (Walker et al., 1996; Bernier et al., 2002). DiMauro valoriza níveis de actividade enzimática inferiores a 40% da média do v.r. normalizado para a citrato sintase (comunicação pessoal, 2009).

No estudo polarográfico dos linfócitos e nas mitocôndrias dos nossos doentes verificou-se concordância entre os resultados traduzidos em percentagem da média do v.r. e os expressos em relação ao limite inferior do v.r. para a oxidação de todos os substratos excepto para a do duroquinol nas mitocôndrias: o número de casos classificados como deficitários é substancialmente maior quando o resultado é expresso em percentagem da média do v.r.

No que diz respeito ao estudo espectrofotométrico da CRM, a tradução da actividade enzimática que se associou a um menor número de casos deficitários em qualquer das preparações musculares (79% nas mitocôndrias e 91% no homogeneizado) foi como *ratio* do complexo II, em percentagem da média do v.r..

A *correção* da actividade do complexo IV para a citrato sintase, traduzida em percentagem da média do v.r., aumentou o número de doentes com valores normais, tanto nas mitocôndrias isoladas, como no homogeneizado de músculo. Aquele aumento foi ainda mais notório com a *correção* para o complexo II. O estabelecimento daqueles *ratios* terá assim aumentado a especificidade dos resultados. No entanto, tal só se verificou quando a actividade enzimática foi expressa em percentagem da média do v.r.. Quando a actividade do complexo IV em mitocôndrias isoladas foi apresentada em nmol/min/mg proteína em relação ao limite inferior do v.r., a proporção de valores normais desceu com a *correção* para o complexo II e ainda mais para a citrato sintase. No homogeneizado de músculo, a *normalização* tanto para a citrato sintase como para o complexo II levou a uma percentagem de valores normais maior, sobretudo no primeiro caso (ver figura 73, página 148).

A avaliação dos resultados da actividade do complexo IV nas mitocôndrias, expressa nas unidades por adoptadas neste trabalho (percentagem da média do v.r. *normalizado* para a citrato sintase) só mostrou concordância com os valores corrigidos para o complexo II (tanto em função do limite inferior do v.r. como em percentagem da média do v.r.). Quanto ao homogeneizado de músculo, houve uma boa concordância (*Kappa* $\geq 0,61$) entre a actividade expressa nas unidades adoptadas e a expressa nas outras unidades analisadas, excepto no que se refere à percentagem da média do v.r. normalizado para o complexo II, em que a concordância foi moderada (*Kappa*: 0,41-0,6). A proporção de relações concordantes entre as diversas unidades para a actividade do complexo IV (isto é, com valores de *Kappa* mais elevados) foi maior no homogeneizado de músculo do que nas mitocôndrias. O processo de isolamento das mitocôndrias leva a uma perda não controlável da actividade da citrato sintase do homogeneizado inicial, já que as mitocôndrias anormais podem ter densidades diferentes, justificando a

necessidade de se proceder à *normalização* da actividade enzimática determinada nas mitocôndrias isoladas de músculo para a citrato sintase (Grazina, 2004).

Da reflexão sobre os resultados do estudo funcional da CRM na globalidade dos tecidos dos 198 doentes pode parecer irrelevante a escolha das unidades em que é expressa a actividade enzimática da CRM, já que a proporção de casos com valores normais não é muito diferente, variando entre 30% e 38% (ver tabelas 34 e 35, páginas 148-9). Do mesmo modo, a correlação dos resultados enzimáticos com a clínica, avaliada através da escala dos critérios gerais de Nijmegen, mostra percentagens de valores normais para o grupo de DCRM definida muito semelhantes (15 a 17%), quando expressos nas diversas unidades. No entanto, a análise de concordância entre a actividade normal e deficitária para as duas categorias diagnósticas analisadas (definido versus possível/ improvável) mostrou valores demasiado baixos (ver página 151). A questão pode assim ser decisiva para o caso individual, uma vez que a um doente pode ou não ser atribuído o diagnóstico de DCRM consoante o modo como são apresentados os resultados dos estudos funcionais, nomeadamente os enzimáticos.

Nos primeiros anos deste estudo, a actividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg proteína em relação ao limite inferior do v.r., tal como o faz o grupo de Rustin, sem ser dado particular relevo aos *ratios* entre os complexos. Com a adopção da expressão da actividade enzimática da CRM em percentagem da média do v.r. *normalizada* para a citrato sintase, o diagnóstico de final teve de ser reconsiderado em vários dos nossos doentes.

Com o objectivo de avaliar a importância desta questão, optou-se por reclassificar os doentes com défice isolado do complexo IV, dado tratar-se de um grupo relativamente homogéneo em termos funcionais. Com a actividade do complexo IV expressa em percentagem da média do v.r. sem *correção* para a citrato sintase, apenas 15 dos 25 doentes manteve a mesma classificação diagnóstica. Dois daqueles doentes *viram* alterado o diagnóstico de DCRM de definido a provável e oito, de provável a definido. A *normalização* para a citrato sintase levava à redução do número de casos com diagnóstico definido, questão de extrema relevância prática.

O uso da citrato sintase ou outras enzimas *marcadoras* como referência para a actividade enzimática dos complexos da CRM diminui a dispersão dos valores normais, como antes notado (Wibom et al., 2002; Grazina, 2004). O grupo australiano, que trabalha apenas com homogeneizados de tecidos congelados, usa a citrato sintase como enzima marcadora. (Thorburn et al., 2004a). O grupo de Nijmegen *normaliza* a actividade enzimática dos complexos da CRM para a citrato sintase ou para o complexo IV, consoante o tecido em causa (Van den Heuvel et al., 2004). O grupo de Rustin usa o *ratio* entre os vários complexos da CRM, nomeadamente a normalização para o complexo

II na avaliação da fracção mitocondrial com o mesmo objectivo (Rustin et al., 1994; Chrétien e Rustin, 2003).

Cada laboratório adoptou um método de avaliar e expressar a actividade dos complexos da CRM, o que torna extremamente difícil o controlo de qualidade de resultados e a realização de estudos multicêntricos (Taylor et al., 2004).

Uma vez que não há relação entre o fenótipo bioquímico e o genótipo nos tecidos habitualmente estudados, como aliás ficou patente também no nosso grupo de doentes, não há modo de comprovar qual o sistema de unidades que está associado a especificidade e sensibilidade mais elevadas (Mirabella et al., 2000).

Para o normal funcionamento da CRM é fundamental que haja equilíbrio entre a actividade enzimática dos vários complexos da CRM, de modo a permitir a adequada reoxidação das coenzimas e evitar a formação excessiva de ROS. Nas DCRM pode encontrar-se um aumento do número ou proliferação de mitocôndrias e/ou elevação da actividade de um ou mais complexos da CRM, traduzindo uma adaptação funcional. Foi demonstrado que, independentemente da normalidade de cada um dos segmentos da CRM, um desequilíbrio entre os mesmos, detectado pela alteração dos respectivos *ratios*, tem consequências funcionais relevantes no que respeita à oxidação de substratos (Geromel et al., 1997).

Na nossa série, seis dos 32 doentes com clínica muito sugestiva de DCRM apresentavam desequilíbrio na CRM, apesar de a actividade dos complexos individuais ser normal. Neste contexto, é significativo que duas das nossas crianças com alteração patogénica do mtDNA, sem critérios enzimáticos de diagnóstico de DCRM, apresentassem desequilíbrio da CRM.

As actividades dos segmentos I+III (NADH - citocromo c oxidoreductase) e II+III (Succinato - citocromo c oxidoreductase) da CRM foram avaliadas em todos os nossos doentes submetidos a estudos enzimáticos da CRM. Optou-se por não usar aqueles resultados como critério de diagnóstico, uma vez que os complexos I, II e III foram individualmente avaliados em todas os casos. Por outro lado, o estudo foi feito em mitocôndrias isoladas em apenas 45% dos nossos doentes e é conhecido que a actividade dos complexos I+III e II+III (dependentes da ubiquinona endógena) não se mantém estável em tecidos congelados (Rustin et al., 1994; Thorburn et al., 2004a). Apesar de não haver concordância entre a actividade dos segmentos I+III e II+III e a dos respectivos complexos isolados, a concordância foi ligeiramente mais elevada nas mitocôndrias do que nas outras preparações, para ambos os segmentos. Nas 40 preparações de homogeneizado de fígado, aquela concordância foi ainda mais baixa, o que pode relacionar-se com o processo de congelamento.

A determinação dos segmentos I+III ou II+III não mede a mesma realidade que o somatório dos respectivos complexos (I: NADH - ubiquinona oxidoreductase; II: succinato - ubiquinona oxidoreductase e III (ubiquinol - ferricitocromo c oxido reductase), embora os pontos de partida e de chegada sejam os mesmos. No nosso grupo de doentes, a coincidência de resultados da actividade enzimática dos segmentos e os do somatório dos seus componentes em termos de défice nas diversas preparações não vai além de 60% (em média), com níveis de concordância baixos ou muito baixos (ver figura 76, página 152). Não se encontrou na literatura referência a esta questão.

A determinação da actividade daqueles dois segmentos pode ser útil quando, apesar dos complexos I, II e III terem actividades normais, ambos os segmentos apresentam défice ou estão no limite inferior do normal, apontando então para um possível défice de CoQ (Boitier et al., 1998). No caso publicado por Boitier os complexos I, II e III tinham actividades normais, apesar dos segmentos I+III e II+III mostrarem défice profundo.

Nas 10 crianças da nossa série com défice de ambos os segmentos I+III e II+III foi igualmente detectado défice de complexos da CRM (nomeadamente do complexo III em oito casos), o que não apontava para um défice específico da CoQ.

Foi demonstrado que os défices do complexo II se traduzem com maior expressão no segmento II+III do que os do complexo III: a medição da actividade do segmento II+III detectaria défices parciais do II, mas não do III (Taylor et al., 1993). No entanto, na nossa série a percentagem de casos com deficiência simultânea no segmento II+III foi ligeiramente maior para os défices do complexo III (30%) do que para os do II (24%), como referido em Resultados (ver página 152). Por outro lado, nos nossos doentes o complexo III parece ter influenciado mais o segmento I+III (60% de casos com défice simultâneo) do que o II+III (30%).

Alguns autores (Chrétien e Rustin, 2003; Thorburn et al., 2004a) questionam a validade do estudo do complexo III e sobretudo do do V em tecidos congelados. Aquelas reservas não são, no entanto, partilhadas por outros. Assim, Marin-Garcia e colaboradores (Marin-Garcia et al., 2003) encontraram défices dos complexos III e V em homogeneizado congelado de músculo em respectivamente 24 e 10 de 25 crianças com encefalopatia de causa indeterminada. Usaram a *normalização* para a citrato sintase, mas não definiram *défice significativo*. Pode-se especular (embora não provar) que esta elevada frequência de défices dos complexos III e V seja metodológica e não real, dando corpo àquelas reservas.

Rustin e colaboradores (Chrétien e Rustin, 2003) chamaram a atenção para a maior frequência relativa de défices do complexo III em tecidos congelados e a sua raridade em amostras frescas. Tal facto dever-se-ia à perda de actividade das enzimas que dependem das quinonas, como o complexo III e os segmentos I+III e II+III, por alteração da integridade da membrana interna da mitocôndria associada ao congelamento. Por outro

lado, o conhecimento daquela labilidade poderá levar a não diagnosticar défices parciais do complexo III (Bénit et al., 2009).

A maior parte dos grupos que realizam o diagnóstico laboratorial das DCRM não usa a determinação da actividade enzimática do complexo V (Trounce et al., 1996; Wibom et al., 2002; Enns et al., 2005). Alguns investigadores defendem que a actividade da ATP sintase em homogeneizados congelados não é estável e por isso não se deve usá-la para diagnóstico (Thorburn et al., 2004a). Outros grupos doseiam o complexo V em mitocôndrias isoladas e/ou homogeneizados frescos ou congelados. Neste último caso, a amostra deve ser usada a curto prazo e não ter sido submetida a congelamentos e descongelamentos sucessivos, de modo a evitar a peroxidação dos lípidos membranares e a desorganização estrutural da membrana interna da mitocôndria, com a consequente dissociação dos componentes F1 e F0 do complexo V (Rustin et al., 1994; Bénit et al., 2006; Janssen et al., 2006a).

O processo usado para o doseamento dos complexos III e V nos nossos doentes (incluindo o tempo de congelação a -80°C antes do doseamento) foi bem aferido e uniformizado (Grazina, 2004). Fez-se uma análise detalhada dos resultados complexos III e V em tecidos congelados nos nossos doentes, com o objectivo de avaliar a relevância clínica do processo de congelação das amostras.

A incidência de défices isolados do complexo III na nossa série de doentes é baixa (nove casos, quatro dos quais com valores inferiores a 20% da média do v.r. *normalizado* para a citrato sintase). O défice do complexo III determinado em homogeneizado congelado foi determinante para o diagnóstico de DCRM definida em apenas dois doentes. Por outro lado, em 41 das 43 crianças em que o complexo III foi investigado em mitocôndrias e em homogeneizado congelado da mesma amostra de músculo verificou-se consistência de resultados, o que reforça a validade do método usado.

No que se refere ao complexo V, nos 52 doentes em que a actividade foi determinada nas mitocôndrias isoladas e no homogeneizado congelado na mesma amostra de músculo, os valores coincidem em mais de três quartos (41) dos casos. Os resultados não apoiam a hipótese de que o congelamento daria origem a falsas deficiências, uma vez que das amostras em que os resultados são díspares, verifica-se mais vezes um resultado normal no homogeneizado do que nas mitocôndrias. O diagnóstico de DCRM definida esteve dependente de um défice *major* isolado do complexo V em homogeneizado de músculo congelado, sem que tenham sido avaliadas as mitocôndrias, em apenas dois dos nossos doentes.

Como foi mencionado anteriormente, a actividade enzimática da CRM é frequentemente determinada em mitocôndrias isoladas de músculo, de linfócitos ou de fibroblastos em cultura (Rustin et al., 1994; Van den Heuvel et al., 2004). Outros grupos usam

preferencialmente o homogeneizado de músculo fresco ou congelado (Thorburn et al., 2004a; Janssen et al., 2006a). Em 41 casos da nossa série, o estudo do complexo IV foi realizado em três preparações diferentes da mesma amostra de músculo: homogeneizado fresco (inicial), mitocôndrias isoladas e homogeneizado congelado. Seria de esperar que os resultados das três preparações fossem sobreponíveis para cada doente, o que se verificou em pouco mais de metade (56%) dos casos. A análise de concordância revelou níveis muito baixos para o par mitocôndrias/ homogeneizado congelado e baixos para mitocôndrias/ homogeneizado inicial e homogeneizado congelado/ homogeneizado inicial. Embora não se possa afastar com segurança a existência de algum problema metodológico no estabelecimento de controlos normais ou no processamento das amostras, a explicação mais plausível é a de que, não sendo gaussiana a curva de distribuição de valores normais para todos os complexos, a definição arbitrária da normalidade como uma percentagem de um valor médio pode fazer com que o mesmo indivíduo apresente valores variáveis, de acordo com o tipo de preparação.

Em 22 dos 41 casos acima referidos, o complexo IV foi investigado também em linfócitos. A conformidade dos resultados do estudo do complexo IV em linfócitos com os das várias preparações musculares foi da mesma ordem de grandeza (50 a 68% dos casos) da das preparações musculares entre si: 68 a 73%; 56% no global (ver figura 78, página 156). Na prática, as várias preparações do músculo comportaram-se como *tecidos diferentes*.

Num dos doentes com síndrome de Leigh (sem estudo em amostra congelada de músculo) em quem se demonstrou uma deleção no gene *SURF1*, havia défice *major* do complexo IV nos linfócitos e no homogeneizado inicial, mas não nas mitocôndrias isoladas de músculo. Se neste caso o estudo do complexo IV se tivesse limitado às mitocôndrias, não teria sido detectado o seu défice, orientador do estudo molecular subsequente.

A análise enzimática de mitocôndrias isoladas e dos homogeneizados preparados a partir de tecido fresco e de tecido congelado devem assim ser encarados como métodos complementares e não alternativos. Se por um lado, o isolamento das mitocôndrias, baseado em métodos densitométricos, pode levar à eliminação das mitocôndrias mais *defeituosas* por terem uma densidade diferente, por outro, o congelamento, armazenamento e descongelamento dos tecidos pode levar a alterações da estrutura mitocondrial, nomeadamente da membrana mitocondrial interna, com consequências na sua função. A análise em mitocôndrias isoladas seria assim mais específica, embora menos sensível que a do homogeneizado (Casademont et al., 2004; Grazina, 2004). O uso de tecidos frescos tem a vantagem adicional de se poder fazer uma avaliação da oxidação global de vários substratos. Nessa perspectiva, alguns grupos como o de Nijmegen, elegeram a avaliação sistemática em homogeneizado fresco (Janssen et al.,

2006a). Outros preferem o estudo em mitocôndrias isoladas (Rustin et al., 1994). Ainda outros, sobretudo por questões que têm a ver com a distância em relação aos locais de colheita das amostras, optam pelo estudo em amostras congeladas (Thorburn et al., 2004a; DiMauro comunicação pessoal, 2009). No nosso caso, abandonou-se a realização sistemática dos estudos a fresco na segunda metade do período de estudo, com o objectivo de racionalizar a utilização de recursos.

A avaliação em linfócitos limitou-se aos complexos II, III e IV, como habitualmente sucede quando se usam estas células (Miró et al., 1999). A determinação dos complexos I e V requer maior volume de sangue e/ou cultura de células (Chretien et al., 2003b; Solaini et al., 2008). Recentemente, foi publicada uma abordagem metodológica que permite a determinação do complexo I em amostras de pequeno volume mediante um processo especial de permeabilização (De Wit et al., 2007).

As actividades dos complexos II, III e IV foram mais vezes normais em linfócitos (cerca de dois terços dos casos) do que no músculo (quase metade dos casos). Tal seria de esperar de alterações do mtDNA pelo facto de os linfócitos serem um tecido proliferativo. Os linfócitos são, neste contexto, menos sensíveis e mais específicos do que o músculo (Thorburn et al., 2004a), o que foi igualmente demonstrado no conjunto dos doentes estudados no Laboratório de Bioquímica Genética do CNC (Grazina, 2004). Tratando-se de uma série pediátrica, o predomínio de alterações do nDNA poderia contrariar aquela tendência, o que não se verificou.

O contributo da anatomo-patologia, nomeadamente a do músculo esquelético, para o diagnóstico das DCRM é muito importante em qualquer idade (Taylor et al., 2004; Kyriacou e Kyriakides, 2006). As *RRF*, as fibras COX negativas e a observação em microscopia electrónica de proliferação e alteração da estrutura mitocondrial têm sido valorizadas como critério de diagnóstico (Walker et al., 1996; Bernier et al., 2002; Wolf e Smeitink, 2002). No entanto, em pediatria aquelas alterações típicas são relativamente raras (Sarnat e Marin-Garcia, 2005). O aumento da actividade oxidativa subsarcolémica, evidenciada pela intensificação da coloração com SDH (método mais sensível para detectar a proliferação mitocondrial), com ocasional formação de crescentes é mais frequente na criança (Wolf e Smeitink, 2002). Na nossa série foram usadas as técnicas histológicas e histoenzimológicas de rotina no estudo destas patologias. A análise de músculo em microscopia electrónica foi realizada num número significativo de casos (90 de 185 cujo músculo foi investigado). Apenas em nove das 200 crianças não foi realizado qualquer estudo histológico devido à escassez da amostra. Em face da maior probabilidade do estudo histológico ser não contributivo para o diagnóstico, foi dada prioridade ao estudo funcional da CRM nesses casos. Apesar de ter sido feito estudo histológico em mais de 95% das crianças, a percentagem de achados positivos

relevantes pode considerar-se muito baixa. Registaram-se critérios histológicos de diagnóstico de DCRM em apenas 12 crianças, sendo *major* em duas e *minor* em 10.

As *RRF* corresponderiam à tradução morfológica das alterações do mtDNA que afectam a síntese proteica mitocondrial (De Vivo, 1993; Sarnat e Marin-Garcia, 2005; Rubio-Gozalbo et al., 2000a). Típicas, mas não patognomónicas de DCRM, as *RRF* podem surgir em outras miopatias, nomeadamente inflamatórias ou associadas ao processo de envelhecimento, sendo muito raras abaixo dos 5 anos de idade. (Rowland et al., 1991; Rifai et al., 1995; Kirby et al., 1999; Patterson, 2004). Cinco de uma série de 42 crianças com défice do complexo I apresentavam *RRF* (Kirby et al., 1999).

Os 185 doentes da nossa série foram submetidos a biópsia muscular numa idade mediana de 4 anos e o número de casos com alteração identificada no mtDNA foi baixo. Isto explicaria o facto de terem sido detectadas *RRF* em apenas duas das nossas 75 crianças com DCRM definida primária e estudo anatomo-patológico do músculo. Uma apresentava KSS com a delecção comum e a outra tinha miopatia mitocondrial (e miocardiopatia hipertrófica, de manifestação mais tardia) com a mutação A3302G do mtDNA. Nestes doentes a biópsia muscular tinha sido realizada aos 14 e 6 anos de idade, respectivamente.

A coloração com enzimas oxidativas como a NADH-TR, a SDH e a COX (correspondentes aos complexos I, II e IV, respectivamente) fornece apenas resultados semiquantitativos da actividade enzimática, mas permite identificar *in situ* variação de actividade em fibras individuais cuja alteração pode não ter tradução nos ensaios enzimáticos (Old e Johnson 1989; Dawson et al., 2003; Carrozo et al., 2007). Enquanto a NADH-TR é inespecífica, pois cora também o retículo endoplásmico (actividade NADH – reductase não sensível à rotenona), as outras são específicas. No entanto, as fibras COX negativas podem ser encontradas em outras miopatias por alteração secundária (Dawson et al., 2003).

Na nossa série, 15 doentes apresentaram aumento da actividade oxidativa subsarcolémica, cinco dos quais com crescentes em mais de 2% das fibras. No entanto, não houve nenhum caso de fibras distintamente COX negativas, apesar de o défice do complexo IV ser o mais frequentemente identificado. A discriminação entre uma actividade residual elevada e a normal pode ser difícil em termos histoquímicos (Rutledge e Finn, 2004). Por outro lado, a heterogeneidade da distribuição das fibras COX negativas pode ter contribuído para aquele resultado (Sarnat e Marin-Garcia, 2005; Haginoya et al., 1990).

No nosso grupo de doentes, as alterações do músculo esquelético em microscopia óptica foram relativamente frequentes (40% do total de 185 doentes e 33% dos 75 casos de DCRM definida primária), mas de um modo geral inespecíficas. Na experiência de Patterson metade dos casos com evidência clínica e analítica de défice da CRM apresentam morfologia muscular normal (Patterson, 2004). O aumento da variabilidade

do diâmetro das fibras, o predomínio das fibras tipo I (oxidativas) ou a atrofia das do tipo II (glicolíticas) que ocorreram em muitas das nossas crianças, embora inespecíficas, têm sido descritos em doentes com DCRM (Enns et al., 2005). O défice do metabolismo oxidativo pode levar à acumulação de glicogénio e sobretudo de lípidos, tal como se constatou num subgrupo dos nossos casos (DiMauro et al., 1973; Chretien e Rustin, 2003). A atrofia muscular neurogénica, demonstrada em alguns das crianças, tem sido descrita nas DCRM e impõe diagnóstico diferencial com outras entidades, nomeadamente a atrofia muscular espinhal (Rubio-Gozalbo et al., 1999; Lee et al., 2007).

A percentagem de achados positivos em microscopia electrónica pode considerar-se muito baixa no nosso grupo de doentes: quatro em 50 crianças com DCRM definida primária e estudo do músculo em microscopia electrónica. Tal pode dever-se ao reduzido número de casos com alterações do mtDNA, à baixa faixa etária da população investigada e à significativa proporção de crianças com doença aguda, uma vez que as alterações morfológicas das mitocôndrias levam tempo a instalar-se. Não se encontrariam alterações mitocondriais típicas antes dos 8 anos de idade (Mierau et al., 2004). No entanto, em várias séries pediátricas tem sido referida uma taxa mais elevada de alterações mitocondriais em microscopia electrónica. Num grupo de 55 crianças com suspeita clínica de DCRM, Mierau (Mierau et al., 2004) detectou alterações na microscopia electrónica em 10 de 18 casos com défice enzimático demonstrado (um caso com *RRF*) e em três com estudo enzimático normal. Numa outra série de 31 crianças com DCRM definida (22) ou provável (22), todas com alterações histológicas do músculo esquelético sugestivas de DCRM e sem referência aos outros critérios de diagnóstico considerados, havia alterações da microscopia electrónica em 48%, sendo que em cinco era a única alteração morfológica (Kyriacou e Kyriakides, 2006). Esta aparente disparidade entre a nossa série e outras pode dever-se a diferenças no tipo de recrutamento dos doentes investigados. Por outro lado, questões técnicas como o reduzido número de cortes estudados e de campos observados podem ter contribuído para a baixa taxa de alterações detectadas. As referidas questões e a heterogeneidade da distribuição das alterações mitocondriais poderão justificar o facto de não terem sido detectadas alterações mitocondriais em microscopia electrónica no tecido muscular da doente com *RRF* e a mutação A3302G do mtDNA. Apesar de terem sido descritos casos com *RRF* não confirmados em microscopia electrónica e considerados falsos positivos (Mierau et al., 2004), tal não parece ser o caso na nossa doente. Finalmente, mas não menos importante, os critérios usados, que incluíram apenas alterações mitocondriais típicas, podem ter também contribuído para o elevado número de casos com microscopia electrónica normal. Não há consenso sobre as alterações estruturais mitocondriais diagnósticas de DCRM. Dado que existe um elevado grau de pleomorfismo nas mitocôndrias, a valorização de atipias de baixo grau é controversa e a definição da fronteira entre o normal e o patológico é frequentemente arbitrária (Mierau et al., 2004;

Patterson et al., 2004). Pode especular-se que os critérios usados na avaliação dos nossos doentes tenham sido muito restritivos.

O uso da microscopia electrónica por rotina no diagnóstico das DCRM é controverso (Bourgeois e Tarnopolsky, 2004; Taylor et al., 2004; Kyriacou e Kyriakides, 2006). Trata-se de uma técnica dispendiosa e trabalhosa que não está disponível em todos os Hospitais. O estudo em microscopia electrónica de um tão grande número dos nossos casos só foi possível graças à colaboração cedida pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Santiago de Compostela.

Nas amostras de miocárdio não foram aplicadas técnicas histoquímicas nem microscopia electrónica, pelo que não se obteve toda a informação morfológica possível.

A maior parte dos nossos doentes com estudo histológico hepático (30 em 38) tinha alterações, sendo a esteatose a mais frequente (13 casos). Não se encontrou relação entre o tipo de esteatose (macro, micro ou mista) e o diagnóstico final, tendo-se concluído por um diagnóstico diferente do de DCRM em seis daqueles 13 doentes.

Embora a infiltração lipídica (macro e microesteatose), a fibrose e a cirrose ocorram tipicamente nas DCRM com envolvimento hepático como as síndromes de depleção do mtDNA, o tipo de esteatose não é orientador do diagnóstico (Morris, 1999; Gordon, 2006). Tratando-se de alterações inespecíficas, são comuns a muitas outras patologias (Sokol e Treem, 1999), como se verificou na nossa série.

Conclui-se pela necessidade de incluir na bateria diagnóstica de DCRM todos os meios disponíveis, incluindo a microscopia electrónica do músculo e dos outros tecidos investigados, uma vez que não há nenhum suficientemente sensível e específico. Este aspecto é particularmente relevante nos casos sem diagnóstico molecular.

A história familiar, quando informativa e em associação com o quadro clínico, é importante para a orientação dos estudos moleculares no caso individual (Thorburn et al., 2004b). Embora paradigmática das DCRM, a hereditariedade materna das mutações do mtDNA nem sempre é óbvia. De um modo geral, é raro identificar uma hereditariedade mitocondrial típica, com todos os descendentes de uma doente do sexo feminino afectados em maior ou menor grau. Tal acontece, não só pelo pequeno número de alterações do mtDNA na criança, frequentemente esporádicas, mas também pela reduzida prole nas famílias actuais (Taylor et al., 2002; Thorburn et al., 2004 a).

O elevado número de casos da nossa série em que o doente era o primeiro ou único filho e a pequena dimensão das fratrias impossibilitaram a definição de um padrão de hereditariedade na maior parte destas famílias. Numa delas, numerosa, com elevado grau de consanguinidade e em que vários membros de ambos os sexos em todas as gerações apresentavam ptose palpebral e/ou atraso intelectual assume-se uma transmissão autossómica dominante. O caso índice, ainda sem diagnóstico molecular, apresentava défice *major* do complexo V em homogeneizado de músculo. Numa das duas

famílias com dois irmãos afectados, ambos preenchiam apenas critérios de DCRM provável. Na outra família, as duas irmãs tinham DCRM definida com défice do complexo IV estando em curso o estudo do gene *SURF1*.

Identificou-se alterações do DNA em 18 das 200 crianças (9%). Investigadas. No entanto, só em oito casos foram consideradas seguramente patogénicas e usadas como critério *major* de diagnóstico. Sem prejuízo da investigação específica caso a caso, a procura de mutações pontuais no mtDNA foi feita segundo três protocolos ao longo do período de estudo, sendo que o objectivo foi ir alargando o leque das alterações rastreadas (ver em Anexos, páginas 257-265): pesquisa específica das mutações mais frequentes por *MS-PCR*, *PCR-RFLP* e finalmente *PCR* seguida de sequenciação de largas zonas do mtDNA onde têm sido mais frequentemente descritas alterações associadas a doença (MITOMAP, 2008).

As alterações do mtDNA que foram pesquisadas em todos os nossos doentes estão mais frequentemente associadas às DCRM com manifestação clínica na adolescência ou idade adulta: grandes deleções (*CPEO*, Síndrome de Pearson, *KSS*) A3243G e T3271C (*MELAS*) A8344G e T8356C (*MERRF*) G11778A, T14484C, G3460A e G15257A (*LHON*). Apesar da ampliação progressiva do estudo do mtDNA, em alguns dos casos mais antigos precocemente falecidos não foi possível prosseguir o estudo molecular por falta de material biológico. A quantidade de tecidos recolhidos por biópsia é sempre problemática em Pediatria, sobretudo na criança pequena. Nem sempre a reserva de sangue periférico ou a cultura de fibroblastos permitem chegar a um diagnóstico de DCRM retrospectivamente, uma vez que as alterações do mtDNA podem não se traduzir naqueles tecidos.

A taxa de alterações patogénicas do mtDNA é significativamente mais baixa nas crianças do que no adulto, embora possa chegar a 25% em alguns centros de referência (Thorburn 2004; Shoubridge, 2001a). Em 2000 doentes de todas as idades consecutivamente investigados, Liang encontrou uma positividade do rastreio de 12 mutações patogénicas comuns e grandes deleções do mtDNA por *PCR-AS* em apenas 5,4% dos casos, o que atesta a importância da selecção dos doentes por um lado e dos métodos usados por outro (Liang e Wong, 1998).

As deleções únicas do mtDNA são de um modo geral esporádicas. Também as mutações do mtDNA ocorrem frequentemente de novo, como já foi mencionado (Thorburn et al., 2004b; Rotig et al., 2004). Na experiência de Thorburn, em mais de 60% de 50 famílias com uma criança afectada por uma mutação do mtDNA não havia qualquer indício de hereditariedade materna (Thorburn et al., 2004b). Nas três famílias da nossa série com mutação patogénica do mtDNA, esta foi também demonstrada nos familiares mais próximos, de acordo com um padrão de hereditariedade materna, mas só num deles havia manifestações clínicas.

Os 6% de alterações patogénicas do mtDNA na nossa série é muito baixo em comparação com 10-25% de outras séries pediátricas (Thorburn, 2004; Darin et al., 2001; Scaglia et al., 2004; Uusimaa et al., 2004). Durante o período do estudo foram assinaladas mais duas crianças com mutação do mtDNA, não incluídas nesta análise por não terem feito biópsia muscular/ hepática: uma assintomática, embora com hiperlactacidémia moderada, com a mutação A3243G, herdada da mãe que sofre de miopatia mitocondrial e outra com a mutação A1555G em linfócitos, que consultou por encefalopatia inespecífica, tendo sido recusada pela família investigação mais invasiva.

Foi demonstrada uma frequência de 18% de mutações pontuais tRNA e deleções em crianças com défices da CRM (Uusimaa et al., 2004). A definição de défice da CRM (actividade enzimática inferior a 90% do limite inferior do v.r.) é no entanto diferente da usada na nossa série. Por outro lado, as regiões do mtDNA investigadas não são exactamente as mesmas, o que pode ter contribuído para a diferença do número de mutantes identificado.

Seria de esperar um maior número de casos com mutações pontuais tendo em consideração a amplitude do rastreio de mutações do mtDNA usado. O número de casos (três) nos quais foram detectadas mutações patogénicas do mtDNA (G11778A, T8993G e A3302G) é de facto muito baixo, o que poderia ser atribuído em parte à baixa idade dos nossos doentes. Está bem estabelecido que as DCRM causadas por alterações primárias do mtDNA se manifestam em idades mais tardias do que as associadas a mutações do nDNA (Rubio-Gozalbo et al., 2000a).

O método de rastreio alargado permitiu a detecção de mutações secundárias de LHON, de significado indefinido, em cinco crianças. Em nenhuma foi detectada atrofia óptica. Uma sofria de retinopatia pigmentar, com alterações típicas no electroretinograma. As designadas *mutações secundárias* de LHON são polimorfismos do mtDNA que têm sido encontrados com maior frequência em doentes de LHON do que na população geral, pelo que se lhes tem atribuído um possível papel sinérgico (Brown et al., 1997). Este papel de factor de *ambiente genético* interferente na manifestação clínica de alterações do mtDNA tem sido atribuído a muitos outros polimorfismos do mtDNA com base na associação de determinados haplótipos com fenótipos clínicos (Torrioni et al., 1997; Carelli et al., 2003). A elevada taxa relativa de mutações secundárias encontradas ilustra bem uma das limitações da sequenciação directa como método de rastreio na prática clínica: a detecção de um elevado número de polimorfismos ou alterações homoplásmicas cujo significado patológico é indeterminado (Wong et al., 2005).

Dada a grande variabilidade do mtDNA, as mutações patogénicas do mtDNA devem ser distinguidas dos polimorfismos para terem valor diagnóstico, o que nem sempre é fácil (Chinnery et al., 1999; Vilarinho et al 1999; Carelli et al., 2002; McFarland et al, 2002; Crimi et al., 2003; MITOMAP, 2008). O grau de heteroplasmia das mutações do mtDNA identificadas nos nossos doentes (classicamente considerado um dos critérios de

patogenicidade) foi avaliado de um modo aproximado por densitometria de bandas, tal como descrito na literatura (Wong e Boles, 2005).

Para além da associação com os clássicos síndromes de Pearson e de Kearns-Sayre, as deleções do mtDNA têm sido ligadas a quadros clínicos muito variados, desde doença multissistémica até vômitos cíclicos ou insuficiência supra-renal (Boles e Williams, 1998; Lacbawan et al., 2000). O rastreio de grandes deleções nos nossos doentes foi feito por *L-PCR* e posteriormente por *FD-PCR*, como referido em Métodos. Em cinco das nossas crianças foi identificada a deleção comum, valorizada como patogénica em apenas duas que apresentavam clínica compatível com a síndrome de Pearson (4404pb) e a de KSS (4977pb). Nos outros com a deleção comum, assim como em mais seis doentes em que se encontraram outras deleções, a patogenicidade não pôde ser demonstrada, nomeadamente pela inespecificidade da apresentação clínica e por não ter sido ainda determinado o grau de heteroplasmia. Esta é uma das limitações da análise molecular dos nossos doentes, o que está em vias de resolução.

De um modo geral, há uma relação directa entre a gravidade clínica e o grau de heteroplasmia das alterações do mtDNA (Ferlin et al., 1997). O mtDNA mutante deve representar 60% ou mais do total do mtDNA para que haja défice da CRM num órgão específico (Boulet et al., 1992; Sciacco et al., 1994). A análise semi-quantitativa do mtDNA e do grau de heteroplasmia pode ser feita por vários métodos com sensibilidade variável. A determinação do número de cópias de mtDNA por PCR em tempo real é actualmente o método de eleição para a quantificação do mtDNA (Wong et al., 2005; Wong e Bai, 2006; Singh et al., 2006). Esta técnica foi recentemente implementada no Laboratório de Bioquímica Genética do CNC e permitirá avaliar o grau de heteroplasmia das alterações do mtDNA e detectar casos de depleção do mtDNA através da sua quantificação (Chabi, 2003).

Um importante subgrupo de casos com DCRM, tanto na criança como no adulto, deve-se a defeitos da comunicação intergenómica que se traduzem por diminuição do número de cópias do mtDNA e/ou deleções múltiplas (Spinazzola e Zeviani, 2005). A síndrome de depleção do mtDNA, que se apresenta frequentemente na infância, tem sido associada a genes envolvidos no metabolismo dos desoxirribonucleótidos: desoxiguanosina cinase (*DGUOK*), polimerase gama (*POLG1*), timidina cinase2 (*TK2*) e o gene codificante da subunidade β da succinil-CoA sintetase -ATP específica (*SUCLA2*) (Saada et al., 2001; Mancuso et al., 2003; Elpeleg et al., 2005; Mancuso et al., 2005; Horvath et al., 2006). Na nossa série foi confirmada depleção do mtDNA no único doente investigado nesse sentido.

A depleção está associada a um grupo heterogéneo de doenças, geralmente de início precoce e correspondente à faixa etária dos doentes em análise. Com a maior disponibilidade da quantificação do mtDNA, vários casos da nossa série que apresentaram clínica compatível poderão vir a revelar-se síndromes de depleção

(Horvath et al., 2006; Oskoui et al., 2006). Outro subgrupo em que deve ser investigada a hipótese de depleção do mtDNA é o das crianças que com défices da CRM múltiplos (20 doentes) ou generalizados da CRM (13 doentes) e rastreio negativo para grandes deleções e as mutações mais comuns que afectam a síntese proteica mitocondrial. De facto, foi recentemente demonstrada depleção do mtDNA (menos de 35% de cópias do mtDNA) em 18% de 270 casos pediátricos com défices múltiplos da CRM (Sarzi et al., 2007).

Dada a frequência crescente com que têm sido relatadas mutações do gene *POLG1*, será de fazer esse estudo nos doentes com encefalopatia epiléptica, mesmo sem envolvimento hepático. O mesmo estaria indicado em todos os casos de encefalopatia de causa desconhecida ou de doença multissistémica com envolvimento neurológico (Horvath et al., 2006).

Estima-se que a maior parte das DCRM com início em idades pediátricas seja causada por mutações nucleares, seguindo padrões de hereditariedade mendeliana (Schon, 2000). O perfil clínico do nosso grupo de doentes aproxima-se mais do que é descrito nas alterações do nDNA: tendência a apresentar-se mais precocemente, com clínica mais uniforme e pior prognóstico do que os quadros clínicos associados a mutações do mtDNA (Rubio-Gozalbo et al., 2000a). De entre as alterações do nDNA mais frequentemente diagnosticadas estão as localizadas em genes que codificam proteínas envolvidas na replicação e manutenção do mtDNA anteriormente mencionados ou factores de *assembling* dos complexos enzimáticos da CRM, como o SURF1 do complexo IV (Land et al., 2004; Schapira, 2006). O baixo número de mutações do nDNA detectadas nesta amostra deve-se provavelmente ao facto de só se ter estudado o gene *SURF1* em casos seleccionados e quantificado o número de cópias de mtDNA em apenas um doente. Rotig e colaboradores (Rotig et al., 2004) sugerem que o estudo do gene *SURF1* está indicado em todos os casos com défice do complexo IV, qualquer que seja o quadro clínico, já que têm sido descritos fenótipos diferentes do da síndrome de Leigh (Robinson, 2000; Shoubridge 2001b). Neste contexto, será de investigar o gene *SURF1* em todos os casos com défice isolado do complexo IV da nossa série. As três crianças em quem foi detectada alteração patogénica do gene *SURF1* apresentaram-se como síndrome de Leigh. Dois tiveram início tardio e evolução crónica e neles foi identificado um défice *major* do complexo IV no músculo. No terceiro, de início precoce, com acidose láctica e evolução rapidamente fatal, em que o estudo dos complexos da CRM em músculo foi normal, uma mutação patogénica no gene *SURF1* foi detectada em heterozigotia. Podemos especular sobre o eventual papel sinérgico dos dois polimorfismos do mtDNA encontrados nesta criança. Como teve miocardiopatia hipertrófica associada ao quadro neurológico, está em curso a sequenciação do gene *SCO2*, uma vez que o estudo da CRM em fibroblastos deste doente mostrou um défice *minor* do complexo IV (Papadopoulou et al., 1999).

Não se tem verificado correlação entre o genótipo mitocondrial e os fenótipos clínico e bioquímico, sobretudo na criança, em que os quadros clínicos são pouco específicos. Nos casos suspeitos de DCRM sem quadro clínico-laboratorial orientador há que avançar para o rastreio de alterações de todo o mtDNA ou para o estudo de híbridos de modo a determinar a origem nuclear ou mitocondrial do defeito genético (King e Attardi, 1989). A quantificação do mtDNA deve estar facilmente acessível e ser realizada perante quadros clínicos sugestivos. Na ausência de alterações detectadas ou no caso de elas sugerirem patologia do nDNA, o resultado do estudo funcional da CRM associado ao quadro clínico poderá ser orientador do segmento do nDNA a investigar. O padrão de alteração funcional da CRM detectado pode ser relevante neste contexto: a presença de défice de mais do que um complexo enzimático da CRM apontaria para uma mutação nuclear ou de genes do mtDNA envolvidos na síntese proteica mitocondrial, consoante estivesse ou não envolvido o complexo II, respectivamente (Sarzi et al., 2007).

6.2 O diagnóstico final

6.2.1 Os critérios de diagnóstico adoptados

As DCRM compreendem entidades nosológicas muito diversas, tanto em termos de idade de apresentação, órgãos ou sistemas atingidos, como de prognóstico, traduzindo-se numa enorme variedade de quadros clínicos mal definidos e parcialmente sobrepostos. Apesar da ausência de relação genótipo-fenótipo na maior parte dos doentes, as classificações genéticas, usadas desde há muito sobretudo em clínica de adultos, são as mais consistentes (De Vivo 1993; DiMauro e Schon, 2006). No entanto, na maioria dos casos pediátricos o diagnóstico é ainda predominantemente clínico-bioquímico-morfológico, mesmo nos centros com mais experiência (Wolf e Smeitink, 2002; Rotig et al., 2004; Thorburn et al., 2004a).

O diagnóstico e a classificação das DCRM são tarefa árdua, complexa, a necessitar de aperfeiçoamento (Naviaux, 2004; Rutledge e Finn, 2004; Miles et al., 2006; Wong e Bai, 2006). As manifestações clínicas e as alterações funcionais e morfológicas das mitocôndrias e mutações do mtDNA/nDNA são a base do diagnóstico, mas o número de peças do *puzzle*, o peso relativo de cada peça e o modo de encaixe são muito diversos e obviamente dependentes dos recursos disponíveis e da experiência individual. Segundo Taylor (Taylor et al., 2004), o diagnóstico das DCRM deveria ser feito de preferência em centros que ofereçam um programa completo, com diferenciação clínica, bioquímica, histoquímica e de genética molecular apoiadas em programas de investigação activos. De facto, dada a sua complexidade, muito do estudo diagnóstico tem de ser realizado num contexto de investigação básica e clínica.

Após a publicação original de Walker em 1996, altura em que o conhecimento das alterações do mtDNA estava a dar os primeiros passos e só se suspeitava de mutações causais do nDNA, variados sistemas de classificação diagnóstica têm sido propostos. Embora cada grupo baseie o diagnóstico em critérios próprios, de um modo geral todos usam a associação da informação clínica com dados bioquímicos, histológicos e/ou moleculares. O diagnóstico de DCRM assente na demonstração de uma mutação patogénica, nuclear ou mitocondrial, associada a clínica sugestiva é consensual (Walker et al., 1996; Nissenkorn et al., 1999, Bernier et al., 2002, Wolf e Smeitink, 2002). A classificação de Walker, apesar de algumas limitações como a inespecificidade das manifestações clínicas (sobretudo na criança) e as frequentes alterações funcionais e estruturais das mitocôndrias e mesmo do mtDNA secundárias a muitas outras doenças ou tóxicos, veio de certo modo uniformizar a *linguagem diagnóstica*. A adaptação dos critérios de Walker à idade pediátrica protagonizada pelo grupo de Melbourne manteve a vantagem da classificação inicial, que é o facto de as alterações serem somáticas, isto é, não ser indispensável fazer em cada doente toda a investigação enumerada (Bernier et al., 2002). A escala de Bernier tem sido a mais amplamente utilizada, talvez por não implicar estudos *a fresco*. No entanto, a escala diagnóstica de DCRM pediátrica do grupo de Nijmegen parece mais adequada, uma vez que utiliza dois conjuntos de critérios: os *gerais* e os *bioquímicos mitocondriais* numa tabela de dupla entrada, como referido em Métodos (páginas 73; 78-81). Por outro lado, os sinais clínicos e sintomas da classificação de Nijmegen foram seleccionados com base em casos com diagnóstico molecular de DCRM (Wolf e Smeitink, 2002). A validade dos *critérios gerais* como indicadores de DCRM foi recentemente confirmada, mostrando-se apropriados para diferenciar um grupo de doentes com DCRM com mutação identificada de um grupo de crianças com outras doenças genéticas (Morava et al., 2006b).

Na classificação dos nossos casos optou-se pela escala diagnóstica de Bernier tendo em conta o tipo de investigação mitocondrial realizada nos nossos doentes e a sua aplicabilidade num estudo retrospectivo. De facto, os estudos mitocondriais funcionais disponíveis não permitiram a aplicação dos critérios de diagnóstico de Nijmegen, uma vez que não se dispunha da oxidação de substratos marcados com ^{14}C , nem da produção de ATP e fosfocreatina. Na aplicação da escala de Bernier à nossa amostra, aos critérios clínicos da escala original foram acrescentados os sinais e sintomas publicados por Munnich, tal como sugerido pelos autores (Munnich e Rustin, 2001; Bernier et al., 2002). Embora a classificação adoptada contemple alguns itens não investigados, tal não foi impeditivo da sua aplicação. É o caso do controlo respiratório, avaliado por polarografia. Apesar de ter sido feito o estudo polarográfico em mitocôndrias isoladas de músculo e em linfócitos na primeira metade do período de estudo, os resultados disponíveis não permitiram calcular aquele parâmetro, uma das limitações do estudo ser retrospectivo. Não foi assim possível detectar casos com eventual desacoplamento entre o consumo de

oxigénio e a síntese de ATP, tal como descrito na doença de Luft (de que se conhecem apenas dois doentes) e mais recentemente em associação com a encefalopatia necrosante aguda infantil (Luft et al, 1962; DiMauro et al, 1976; Neilson et al, 2003; Luft, 2006).

A aplicação dos critérios de DCRM de Bernier levou à classificação dos nossos doentes como sofrendo de DCRM definida em quase metade dos casos (n=95). O facto de os grupos com diagnóstico improvável (18 casos) ou possível (10 casos) serem tão reduzidos pode dever-se a duas ordens de razões: o critério de selecção dos doentes e a elevada taxa de défices enzimáticos da CRM encontrados. No que diz respeito à selecção dos doentes, só foram incluídos na análise as crianças submetidas a biópsia diagnóstica (na maioria dos casos programada para esse fim) ou a colheita *post mortem*. Trata-se de um grupo de doentes com manifestações clínicas particularmente graves, pelo que a probabilidade de se chegar a um diagnóstico deveria ser significativa. A elevada taxa de défices da CRM encontrados pode ser consequência da primeira, isto é da gravidade dos quadros clínicos, com um potencial de alterações secundárias impossível de calcular.

O facto de em muitos doentes ter sido feito estudo de mais do que um tecido (músculo esquelético, fígado e/ou miocárdio), sendo valorizado o valor mais baixo de actividade enzimática encontrado em qualquer deles, contribuiu igualmente para o elevado número de diagnósticos de DCRM. Se o estudo enzimático se tivesse limitado aos complexos I, II, III e IV no músculo, como acontece na maior parte das séries, o número de diagnósticos de DCRM definida seria de 91 e não 95. Inversamente, se tivessem sido usadas as actividades dos segmentos I+III e II+III no diagnóstico enzimático, mais cinco doentes seriam integrados no grupo das DCRM definidas. Do mesmo modo, se o resultado do estudo enzimático da CRM em linfócitos tivesse sido incluído no diagnóstico, acrescentar-se-ia ao grupo de DCRM definida mais oito novos casos: quatro crianças em que um défice *major* em linfócitos não foi verificado no músculo e outras quatro nas quais o défice *minor* do mesmo complexo em dois tecidos (linfócitos e outro) constituiria critério *major* de diagnóstico.

Uma das críticas que pode fazer-se à classificação adoptada neste estudo é a de que mesmo uma clínica muito inespecífica pode pontuar e facilmente levar a um diagnóstico definido desde que haja alteração funcional da CRM, que pode ser secundária. Em apenas 13 crianças se associaram critérios maiores clínicos e critérios maiores laboratoriais e só em cinco destas se identificou coexistência de dois critérios maiores laboratoriais. De facto, em 80 das 95 crianças com DCRM definida que apresentaram apenas critérios clínicos *minor* (19 das quais cumpriam apenas um critério clínico) o único critério *major* que suportou o diagnóstico foi o défice enzimático *major* da CRM em todos os casos, excepto num. Uma proporção não desprezável (17) das 80 crianças acima referidas teve um outro diagnóstico etiológico, pelo que foram consideradas DCRM definidas secundárias. É no entanto impossível negar que entre os doentes com o diagnóstico de

DCRM definida primária haja mais casos secundários, porventura não identificados como tal.

Observaram-se critérios clínicos *major* em apenas 18 dos nossos doentes, o que representa menos de 10% da amostra total. Este facto reflecte por um lado a raridade com que na criança se observam as síndromes mitocondriais clássicas, habitualmente associadas a alterações do mtDNA. Por outro, o elevado índice de suspeição levou à investigação de muitos doentes apenas com base em sinais clínicos e laboratoriais inespecíficos, por vezes em situações extremas, como já referido.

De entre os casos com encefalopatia clinicamente completa, a síndrome mais frequente foi a de Leigh, como é habitual nas séries pediátricas. Apesar de muitas crianças apresentarem epilepsia no início ou durante a evolução, não foi registado nenhum diagnóstico de síndrome de Alpers, isto é, com os critérios electroencefalográficos clássicos e insuficiência hepática, pelo que o gene *POLG1* não tinha sido investigado em nenhum doente até ao fim do período do estudo. Na única criança com demonstração de alteração da comunicação intergenómica (mutação no gene *DGUOK*), o quadro era o de insuficiência hepática predominante. Nesta, a suspeita inicial de défice de α -1-antitripsina (com padrão electroforético típico e demonstração de grânulos de α -1-antitripsina na histologia hepática) foi abandonada face ao envolvimento neurológico (hipotonia) e à hiperlactacidémia que levaram à suspeita de DCRM. Este caso ilustra bem as questões de diagnóstico diferencial colocadas nestes doentes. O primeiro doente desta série com DCRM definida, cujos resultados do estudo enzimático foram confirmados pelo grupo de A. Munnich, teve um quadro compatível com encefalopatia mitocondrial letal infantil. A criança com síndrome de Pearson apresentou-se como anemia grave e acidose láctica ao nascimento e teve uma evolução típica. Pelo contrário, a doente de LHON é atípica não só pelas alterações neurológicas associadas à atrofia óptica como sobretudo pela precocidade da apresentação clínica e por se tratar de uma menina (Grazina et al., 2007). Nas doentes com clínica sugestiva de *MELAS* e de *NARP* não foram identificadas as mutações típicas no mtDNA. Finalmente, quatro crianças preencheram os critérios de *citopatia mitocondrial* estabelecidos por Bernier. Um dos referidos critérios é a exclusão de outras possíveis causas metabólicas e não metabólicas para o quadro clínico, o que levanta a pertinente questão de o quê e até onde investigar em cada caso.

Na presente série, as alterações neurológicas predominaram entre os critérios clínicos *minor*. As manifestações oftalmológicas (mormente a deficiência da motilidade extra-ocular) e musculares foram também frequentes, corroborando a designação de encefalomiopatias classicamente atribuída às DCRM.

Entre as alterações neurológicas, destaca-se o atraso de desenvolvimento psicomotor, a hipotonia e a epilepsia, sintomas inespecíficos e que implicam diagnósticos diferenciais muito vastos. Em 12 das nossas 20 crianças com doença do espectro autista e hiperlactacidémia foi diagnosticada DCRM definida com base em défices funcionais *major*

da CRM em músculo. Um subgrupo destes doentes foi objecto de publicação (Oliveira et al., 2005).

Os défices energéticos cursam frequentemente com clínica pré-natal, nomeadamente restrição de crescimento intra-uterino e malformações (Cormier-Daire et al., 1996; Castro-Gago et al., 1999; Saada et al., 2007). Um quarto dos doentes da nossa série (50 crianças) tinha tido manifestações clínicas ante-natais, com predomínio do atraso de crescimento intra-uterino. Este, presente em 26 crianças, constituiu um critério clínico *minor* incluído no grupo das *alterações nutricionais*. Neste grupo de critérios de diagnóstico destacou-se também pela sua frequência o atraso de crescimento pós-natal. Assim, cerca de metade das crianças da nossa amostra (92 casos) pontuaram um critério *nutricional* (clínico, *minor*).

O envolvimento hepático, traduzindo-se por insuficiência hepática com esteatose/cirrose e o cardíaco, nomeadamente miocardiopatia e arritmias são relativamente frequentes nas DCRM, mormente na criança (Munnich et al., 2001; Garcia-Cazorla al., 2006). Mesmo na ausência de manifestações clínicas evidentes, a avaliação da função hepática e cardíaca deve fazer parte do rastreio multissistémico na caracterização destas doenças (Munnich et al., 2001; Bindoff, 2006; Towbin, 2006). Em 30 das nossas crianças foram registadas alterações hepáticas, 10 na apresentação (quatro das quais com insuficiência) e as restantes no decurso da evolução. Duas cumpriam critérios clínicos *major* (uma com síndrome de depleção e outra com doença multissistémica).

Vinte e duas crianças investigadas tinham atingimento cardíaco. Em 11 havia manifestações cardíacas no início do quadro clínico, nomeadamente miocardiopatia e arritmia.

A síndrome de Fanconi total ou parcial, a síndrome nefrótica e a nefropatia tubulointersticial têm sido descritos em crianças com DCRM (Rotig e Niaudet, 2006). Especificamente, a nefropatia pode ser uma forma de apresentação do défice em CoQ (Diomedi-Camassei et al., 2007). Na nossa série de doentes, a tubulopatia proximal foi o critério *minor* renal mais frequentemente invocado (sete casos). A doente com síndrome nefrótica submetida a transplante renal (que se apresentou como atraso de desenvolvimento psicomotor e epilepsia) desenvolveu miocardiopatia hipertrófica. Teve o diagnóstico de DCRM definida primária, uma vez que tinha um critério clínico *major* (doença multissistémica, curso clínico progressivo e exclusão de outras causas) e três critérios menores laboratoriais (hiperlactacidémia, défice *minor* enzimático da CRM em músculo e uma deleção do mtDNA de patogenicidade não comprovada). Atendendo ao quadro clínico, está em curso o doseamento da CoQ em fibroblastos.

As alterações endócrinas estiveram pouco representadas nas nossas crianças, provavelmente devido à sua baixa faixa etária. A diabetes *mellitus*, a endocrinopatia que leva mais vezes à suspeita de DCRM, está frequentemente associada a mutações do mtDNA, manifestando-se clinicamente no adulto jovem (Yialamas et al., 2006).

As alterações *dermatológicas*, registadas em 10 das nossas crianças (sete e três casos com os diagnósticos de DCRM provável e de DCRM definida primárias, respectivamente) limitaram-se à acrocianose e à hipertricrose. O grupo de A. Munnich valoriza outras manifestações como tricotiodistrofia e pigmentação anormal em áreas expostas à luz entre outras, que não foram detectadas na nossa amostra (Bodemer et al., 1999; Munnich, 2001).

Em três casos ocorreu morte súbita. Num deles (que preencheu critérios de DCRM improvável) foi diagnosticado pneumonia e golpe de calor. Nos outros dois, um com atraso ponderal e história de um irmão também falecido inesperadamente foi considerado sofre de DCRM provável primária e o outro, sem doença prévia, teria DCRM improvável. Em ambos os casos primários foi excluída a síndrome do QT longo, não tendo sido feito estudo histológico ou da CRM do miocárdio. Na classificação diagnóstica adoptada a morte inexplicada está prevista como critério de diagnóstico quando no caso *índex* se se tratar de um nado-morto com pobreza de movimentos intra-uterinos ou se ocorrer no período neonatal (Bernier et al., 2002). Deste modo, o caso de DCRM improvável primária (morte súbita aos 4 anos de idade, sem doença prévia) não preencheu qualquer critério de diagnóstico clínico ou laboratorial. A hiperlactacidémia verificada logo após a reanimação da paragem cardíaca, não se manteve durante o período de morte cerebral subsequente, pelo que não foi valorizada como critério diagnóstico. Na classificação de Nijmegen, a morte súbita e inesperada não é valorizada como critério de diagnóstico, excepto quando ocorre em familiares no período neonatal ou na infância. O défice do complexo I com alterações morfológicas mitocondriais cardíacas (Thorburn, 2006 comunicação pessoal) e a presença de mutações do mtDNA (Opdal et al., 1999; DiMauro e Schon, 2006) foram associados à morte súbita, o que a indicia como um possível critério clínico diagnóstico de DCRM.

Os dados da imagem cerebral, nomeadamente da RMN e da ¹H-RMS, são mais valorizados na classificação de Nijmegen do que na do grupo de Melbourne, como já referido. Neste inclui-se apenas a leucodistrofia como critério neurológico *minor* e os picos de lactato na espectroscopia como critério metabólico *minor*. A análise dos resultados da RMN cerebral das nossas crianças com DCRM vai ser publicada na *Pediatric Neurology*.

No que diz respeito aos critérios laboratoriais, destaca-se na nossa série o elevado número de défices enzimáticos da CRM (como já referido) e de casos com alterações metabólicas e a pobreza de alterações histológicas, mesmo em microscopia electrónica. Atrás fez-se referência à inespecificidade da elevação do lactato, alanina e/ou prolina, que pontuam como critério metabólico *minor* na escala usada, mesmo se só pontualmente observada. Pelo contrário, o grupo de Nijmegen valoriza, neste contexto, a persistência da elevação do lactato (em três ou mais determinações) e o aumento do

ratio lactato/piruvato, tradutor da acumulação de NADH e FADH₂ (ver em Métodos, tabela 5, página 78-81).

Embora valorizados como indicador de DCRM por alguns grupos, como o de A. Munnich (Munnich, 2006), os corpos cetónicos não figuram como critério de diagnóstico em nenhuma escala diagnóstica publicada. No nosso grupo de crianças não foi possível demonstrar para a cetonémia um valor indicativo de DCRM, como já referido. Também num estudo prospectivo do grupo de Nijmegen, o nível e o *ratio* dos corpos cetónicos plasmáticos pós-prandiais foram semelhantes nos casos com e sem défice da função oxidativa em biópsia de músculo (Rubio-Gozalbo et al., 2000b).

O estudo histológico dos doentes desta série revelou-se particularmente pobre, com anteriormente discutido. Na escala adoptada, só a presença de *RRF* em mais de 2% das fibras constitui critério *major*, o que se verificou em apenas dois casos, ambos com alterações do mtDNA. As alterações mitocondriais difusas em microscopia electrónica em qualquer tecido constituem apenas critério *minor*, uma vez que podem estar secundariamente associadas a grande número de outros processos patológicos. Apesar disso, aquelas alterações verificaram-se em apenas cinco das 90 amostras de músculo investigadas nos nossos doentes. Por outro lado, as amostras de fígado e miocárdio dos nossos doentes não foram objecto de observação em microscopia electrónica.

Nas oito crianças com DCRM definida primária e alteração patogénica do mtDNA e/ou do nDNA, o estudo funcional da CRM no músculo, realizado em sete, foi normal em três. Nos 77 doentes com DCRM definida primária que fizeram estudo enzimático da CRM, em 71 casos o défice de um ou mais complexos da CRM foi o único critério *major* (e portanto determinante do diagnóstico de DCRM).

O facto de grande parte dos diagnósticos de DCRM definida dos nossos doentes terem sido baseados em défices enzimáticos da CRM, levou à reavaliação do seu diagnóstico. Sem entrar em linha de conta com os estudos molecular e enzimático, comparou-se os novos graus de diagnóstico assim obtidos com o resultado da classificação segundo os *critérios gerais* de Nijmegen. Em 83 dos 200 doentes, o nível de diagnóstico seria semelhante. Dos restantes, muito mais crianças atingiriam um nível superior em um ou dois pontos (81 e 10 casos, respectivamente) com a classificação de Nijmegen do que com a de Bernier *adaptada*, o que atesta a segurança dos argumentos clínico-laboratoriais em presença. Do ponto de vista clínico e laboratorial geral, isto é, excluindo a espectrofotometria da CRM e o estudo genético, o nosso grupo de doentes é assim mais valorizado como tendo quadros clínicos sugestivos de DCRM na classificação de Nijmegen. Poder-se-à concluir que, apesar de o défice da actividade enzimática da CRM ser o critério *major* que determinou o diagnóstico de DCRM definida na maior parte dos casos, os outros parâmetros, quando avaliados separadamente, corroboram os resultados do estudo enzimático realizado.

O diagnóstico de DCRM baseou-se assim na clínica e no estudo bioquímico da CRM, tal como seria de esperar numa população pediátrica em que a maioria das DCRM se deve a alterações do nDNA (Rubio-Gozzalbo et al., 2000a). No entanto, a origem primária dos critérios clínicos, morfológicos e enzimáticos é incerta na maior parte dos casos.

A valorização diagnóstica de alterações do mtDNA implica o cumprimento de critérios de patogenicidade bem estabelecidos, embora a heteroplasmia conte com várias excepções (Cortopassi e Arnheim 1990; Chinnery et al 2000; Chinnery e Schon 2003). Na criança, ao contrário do idoso, a possibilidade de modificações secundárias do mtDNA é remota, excepto quando devidas a perturbação da comunicação intergenómica. Esta traduz-se em deleções/ rearranjos múltiplos ou diminuição do número de cópias do mtDNA (Alberio et al., 2007).

6.2.2 O grupo dos doentes com doença mitocondrial definida

Noventa e cinco das 200 crianças cumpriam critérios de DCRM definida. Em 78 destas não se encontrou outra causa que explicasse a situação clínica, pelo que se considerou que sofriam de doença primária da CRM. Este grupo foi objecto de publicação (Diogo et al., 2009), conforme transcrito em Anexos (páginas 283 a 288).

Um dos propósitos desta revisão foi procurar sinais e sintomas característicos de DCRM na criança diferentes dos usados como critérios de diagnóstico e que pudessem vir a reforçá-lo e contribuir para o diagnóstico diferencial. Nenhum dos parâmetros clínicos ou laboratoriais analisados cumpriu aquele requisito.

As manifestações clínicas muito precoces verificaram-se tanto no conjunto das 200 crianças como no grupo das 78 com DCRM definida primária. A mesma distribuição etária da apresentação das DCRM na criança foi constatada por outros grupos (Naviaux, 2004). Não se encontrou correlação entre a idade de início e o diagnóstico final (grau de certeza de DCRM e primário ou secundário). Ao contrário das outras DHM (que vão no entanto sendo cada vez mais diagnosticadas também na idade adulta) as DCRM, inicialmente conhecidas como doenças do adulto jovem, revelam-se tanto no adulto como na criança (Skladal et al., 2003).

Relativamente aos antecedentes pessoais e familiares também não se identificaram características distintivas de DCRM. As primeiras manifestações clínicas das DCRM são ocasionalmente pré-natais. As complicações gravídicas do grupo da eclâmpsia poderiam ser uma manifestação de DCRM, pelo menos em algumas famílias, ou consequência de um defeito fetal e placentar da oxidação dos ácidos gordos (Torbergson et al., 1989; Rakheja et al., 2002; Racine et al., 2004). No entanto, aquelas complicações não foram mais frequentes nas crianças com DCRM. Ao contrário do expectável, houve maior incidência de abortamentos/mortes fetais no grupo sem DCRM definida primária e foi semelhante a proporção de mortes inesperadas em familiares.

O que sobressai nesta investigação é a inespecificidade da clínica de apresentação e de evolução das DCRM na criança, tal como foi documentado pela inexistência, nos parâmetros analisados, de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de doentes com e sem DCRM definida primária e entre os grupos de crianças com DCRM definida primária e com DCRM possível/improvável primária.

6.2.3 Doenças da cadeia respiratória mitocondrial secundárias

O diagnóstico de DCRM definida pela classificação de Bernier não permite distinguir os casos primários dos secundários, senão quando se identifica a alteração do DNA subjacente. No entanto, há a salvaguarda da necessidade de excluir todas as outras causas possíveis para que se possa valorizar como critério *major* a existência de uma doença multissistémica, progressiva ou com história familiar materna positiva.

Apenas 38 dos 200 doentes da nossa série (19%) tiveram outro diagnóstico, número baixo, mas esperado, dada a selecção feita. De facto, só foram incluídos os casos com suspeita de DCRM que justificaram a investigação em tecidos de biópsia ou *post mortem*. Cerca de dois terços (78) dos 116 doentes com uma causa identificada tiveram o diagnóstico final de DCRM primária. Quase metade (17) das 38 crianças com um outro diagnóstico etiológico apresentou um critério laboratorial *major* (enzimático da CRM e /ou histológico), sendo classificada como DCRM definida secundária. Este último grupo correspondeu a 18% dos 95 casos de DCRM definida.

Numa proporção considerável (42%) dos nossos doentes não se chegou a um diagnóstico etiológico, pelo que se levanta a questão de saber se a investigação etiológica foi suficientemente exaustiva, nomeadamente no que se refere a outras causas possíveis para os quadros clínicos particulares. Pode sempre conjecturar-se que se podia ter ido mais além na investigação etiológica, nomeadamente no estudo do cariótipo, para o qual se dispõe actualmente de técnicas mais sensíveis. A investigação foi, no entanto, bastante alargada, mormente nos casos de evolução fatal.

Em face da multiplicidade e importância funcional da mitocôndria, é de esperar que os mecanismos patogénicos de variadíssimas doenças englobem uma disfunção da via comum final da produção de energia, ainda mal elucidada (Marin-Garcia et al., 1996; Neilson et al., 2003; Enns et al., 2003; Ventura et al., 2005; Schwab et al., 2006). Têm sido descritos elevação do lactato, défices enzimáticos da CRM e /ou alterações mitocondriais morfológicas em inúmeras patologias (Jongpiputvanich et al., 2005; Hui et al., 2006; Schwab et al., 2006). A taxa elevada do lactato, constatada numa grande percentagem das crianças desta série, pode ser devida a outras doenças hereditárias do metabolismo, que não terão sido investigadas exaustivamente. É o caso do défice da biotinidase e do da piruvato-desidrogenase que deveriam ter sido especificamente investigadas mais vezes, em face do elevado número de casos com doença neurológica e

hiperlactacidémia (Mitchell et al., 1986; Zeviani et al., 1996; Hui et al., 2006). A valorização diagnóstica de hiperlactacidémia é por vezes difícil, quer num contexto de doença grave associada a hipoperfusão de qualquer etiologia, quer em muitas doenças crónicas, nomeadamente neurológicas, em que a origem da elevação do lactato não é clara (Duke, 1999; Kang et al., 2001).

Défices enzimáticos da CRM em muitas doenças hereditárias do metabolismo e outras têm sido objecto de reflexão (Martinez Bermejo et al., 1994; Hui et al., 2006; Enns, 2003). Em quatro das 12 crianças da nossa série com doenças hereditárias do metabolismo foi identificado um défice da CRM. As doenças da glicosilação das proteínas são patologias multissistémicas que implicam um diagnóstico diferencial com as DCRM (Briones et al., 2001, Hui et al., 2006). Uma vez que cerca de metade das proteínas do organismo humano são glicosiladas, é admissível que um defeito na glicosilação possa interferir na função de um ou mais complexos enzimáticos da CRM. Nos dois doentes com aquele défice, o estudo funcional da CRM em tecidos, realizado antes do da transferrina deficiente em carboidratos, (análise só disponível na segunda metade do período de estudo) mostrou défice *major* da CRM.

Nas DCRM pode haver défice secundário da β -oxidação dos ácidos gordos devido à acumulação de cofactores reduzidos, NADH e FADH₂, demonstrável pela acidúria orgânica e/ou perfil de acilcarnitinas característicos. Inversamente, têm sido descritos défices secundários da CRM nas doenças da β -oxidação dos ácidos gordos (Hui et al., 2006; Sim et al., 2002). Foi documentado que os ésteres de acil-CoA de cadeia longa inibem a síntese de ATP e o consumo de oxigénio por obstrução ao transporte de succinato (Ventura et al., 2005). Num dos nossos casos com o diagnóstico de *MADD*, por défice da flavoproteína transportadora de electrões, a CRM em mitocôndrias isoladas de músculo foi normal. Contudo, num outro doente, com *MADD* por deficiência da oxidoreductase da flavoproteína transportadora de electrões – ubiquinona, a presença de défices *major* da CRM em mitocôndrias de músculo (complexos III, IV e V) pode ter contribuído para a maior gravidade do quadro clínico, de início mais precoce e evolução fatal. Situações semelhantes foram reportadas por outros autores (Olsen et al., 2007), que descreveram défices secundários da CRM associados à *MADD* por défice da oxidoreductase, com resposta positiva à riboflavina, o que não se verificou no nosso doente. A criança com o diagnóstico final de *LCHADD* apresentou uma doença multissistémica grave de evolução rapidamente fatal, pelo que foi submetida a investigação de DCRM. Com o alargamento do rastreio neonatal em Portugal a partir de 2005, que engloba actualmente grande parte dos defeitos da oxidação dos ácidos gordos (<http://www.diagnosticoprecoce.org/>), a investigação diagnóstica destes doentes é mais rápida e fácil e não inclui o estudo da CRM. A determinação do perfil de acilcarnitinas do sangue por MS/MS - *tandem mass spectrometry* (usado actualmente no rastreio neonatal) faz agora parte dos estudos a realizar antes de métodos mais invasivos como a biópsia. Para além da sua utilidade no

diagnóstico diferencial, pode mostrar alterações dos ácidos orgânicos indicativas de patologia mitocondrial.

Défices enzimáticos da CRM, transformações morfológicas mitocondriais e/ou alterações do mtDNA têm sido demonstrados em várias miopatias e neuropatias (Wiedemann et al., 1998; Berger et al., 2003; Jongpiputvanich et al., 2005; Vondracek et al., 2007). Por sua vez, as DCRM podem traduzir-se clinicamente por quadros que simulam outras doenças neuromusculares, pelo menos durante uma parte da sua evolução (Rubio-Gozalbo et al., 1999; Lee et al., 2007). Nas nossas duas crianças com doença de Pompe juvenil, o estudo funcional da CRM em músculo foi normal. A microscopia electrónica do músculo mostrou alterações mitocondriais, a par da acumulação lisossómica de glicogénio, na criança com clínica mais grave e mais precoce. Nesta doente houve alguma dificuldade diagnóstica, já que a actividade da α -glicosidase foi normal nos leucócitos, vindo a revelar-se deficitária nos fibroblastos. Na criança com distrofia muscular de Ullrich, confirmada mais tarde por estudo molecular, o diagnóstico inicial de miopatia mitocondrial foi baseado na identificação de défices múltiplos *major* da CRM (III, I+III, IV e V) em homogeneizado de músculo. Curiosamente, foi documentada uma diminuição do limiar de abertura do poro mitocondrial de permeabilidade transitória (*mitochondrial permeability transition pore*) com aumento da ocorrência de apoptose nos mioblastos de doentes com distrofia muscular de Ullrich, pondo em evidência a disfunção mitocondrial e abrindo caminho para novas abordagens terapêuticas (Angelin et al., 2008).

Em sete dos 10 casos da nossa série com infecção (viral em nove) foi demonstrado défice funcional da CRM. Embora as manifestações clínicas e a evolução destes doentes se possam atribuir à infecção, não pode ser excluída a hipótese de haver um défice mitocondrial funcional subjacente, agravado pela infecção. A existência de uma DCRM revelada por uma infecção aparentemente banal poderia explicar a evolução inesperadamente desfavorável que se verificou nestes doentes, oito dos quais faleceram. Na literatura consultada, não se encontrou resposta clara a estas questões. As DCRM poderiam manifestar-se por défice imunitário, tal como decorre da neutropenia nas síndromes de Pearson e de Barth (Finsterer, 2007). Foi descrito um caso de depleção do mtDNA associado a imunodeficiência dos linfócitos T (Reichenbach et al., 2006). Por outro lado, as infecções virais podem alterar o funcionamento mitocondrial normal, nomeadamente os processos de fissão e fusão, tal como foi demonstrado na infecção a citomegalovírus (McCormick et al., 2003). O transportador ADP/ATP poderia desempenhar o papel de auto-antígeno em certas miocardites e miocardiopatias dilatadas associadas a infecções virais. A disfunção do transportador de nucleótidos induzida pela infecção viral seria responsável pela alteração da função cardíaca desses casos (Schulze e Schultheiss, 1995). A sepsis cursa com hipoxia tissular e excesso de produção de óxido nítrico, inibidor da respiração mitocondrial *in vitro*. Baixas concentrações de ATP muscular foram

associadas a mau prognóstico em doentes com sepsis (Brealey et al., 2002). Por outro lado, foi demonstrado um déficit do complexo IV em ratos com sepsis induzida e, em consequência, proposta a administração de citocromo c como terapêutica (Levy et Deutschman, 2007). A única criança da nossa série com sepsis documentada era um recém-nascido de termo com parto por cesariana por apresentação pélvica, sem asfixia, que se apresentou no primeiro dia de vida com hipotonia generalizada e hipoglicémia. Evoluiu com falência multiorgânica com acidose láctica persistente e multi-enfartes cerebrais, falecendo aos 13 dias de vida. Foram isolados *Enteroco Faecalis* e *Enterobacter species* na hemocultura e documentado déficit da CRM no fígado e no miocárdio (generalizado e múltiplo, respectivamente), mas não no músculo. Assumiram-se as alterações da CRM como secundárias à infecção, uma vez que aqueles dois germes, muitas vezes encontrados em associação, são causa de sepsis neonatal grave (Gupta et al., 2005; Martínez -Odriozola et al., 2007; Mullane, 2007). No entanto, como neste recém-nascido não havia factores de risco conhecidos para a colonização com estas espécies bacterianas, pode-se especular sobre a existência de um déficit da CRM subjacente agravante do prognóstico (Benca et al., 2007; Hufnagel et al., 2007).

A síndrome de Shwachman-Diamond, que se manifesta por insuficiência pancreática exócrina, neutropenia ou pancitopenia e displasia esquelética com baixa estatura, põe problemas de diagnóstico diferencial com as DCRM, tal como aconteceu com a nossa doente, investigada inicialmente por suspeita de síndrome de Pearson. Não se encontrou na literatura qualquer referência à associação entre DCRM ou disfunção mitocondrial e a síndrome de Shwachman-Diamond, de resto também não identificada na nossa doente (Shimamura, 2006; Costa et al., 2007).

6.2.4 Factores de possível interferência no diagnóstico

Na interpretação do diagnóstico final das crianças desta série há outros factores a ter em conta, para além da possibilidade de uma doença subjacente com alterações mitocondriais secundárias, a saber: a medicação a que o doente estava submetido aquando da biópsia, o possível efeito da anestesia usada para a sua realização e o intervalo de tempo entre a colheita e o processamento, as circunstâncias de armazenamento e as condições de transporte da(s) amostra(s) biológica(s). No caso de colheitas *post mortem*, as possíveis alterações decorrentes do estado agónico e da morte são também de considerar.

A lesão mitocondrial induzida por fármacos é comum e poderia explicar muitos dos seus efeitos adversos (Brinkman et al., 1999; Fosslie, 2001; Arenas e Martín, 2003; Neustadt e Pieczenik, 2008). Quase metade (46,5%) das crianças deste estudo estava medicada, em politerapia na maior parte dos casos (75%). Foi verificada a medicação usada pelos doentes aquando da colheita de tecidos e a sua eventual influência no

diagnóstico final através da possível interferência nos critérios de diagnóstico laboratoriais, nomeadamente a hiperlactacidémia e os défices funcionais da CRM.

O paracetamol é uma causa importante de insuficiência hepática induzida por fármacos (William, 2004). É transformado pelo citocromo P450 num metabolito tóxico no fígado que se conjuga com o glutatião, sendo excretado na urina. Em caso de intoxicação, ocorre uma depleção hepática do glutatião, com acumulação de ROS e diminuição da respiração mitocondrial (Dong et al., 2000; Jaeschke e Bajt, 2006). A criança falecida com insuficiência hepática aguda por intoxicação com paracetamol aos 9 meses de idade tinha aumento da actividade da citrato sintase e do complexo III e diminuição severa da actividade dos complexos I, II, IV e V em amostra de fígado colhida imediatamente após a morte. A existência de depleção do mtDNA subjacente, não excluída durante o período do estudo, dificilmente explicaria o défice acentuado da actividade do complexo II (Sarzi et al., 2007).

Muitos dos nossos doentes estavam sob terapêutica anticonvulsivante aquando do estudo. O valproato de sódio foi objecto de particular atenção pela generalização do seu uso e pela conhecida interferência com o metabolismo mitocondrial, nomeadamente a nível da CRM (Luís et al., 2007). O ácido valpróico e os seus metabolitos inibem a β -oxidação dos ácidos gordos no fígado (Coulter DL, 1984; Baillie, 1992; Van Wouwe, 1995; Fromenty et Pessayre, 1997; Lam et al 1997; Delarue et al., 2000; Silva et al., 2001; Chitturi e George, 2002; Eyer et al., 2005; Knaap et al., 2008). A administração aguda ou crónica de doses elevadas de valproato em ratos foi associada a deficiência da CRM (Rumbach et al., 1983; Ponchaut et al., 1992). A medicação com valproato pode estar na origem de citopatia mitocondrial com deposição lipídica microvesicular no músculo e alterações mitocondriais estruturais (Kimura et al., 1989; Melegh e Trombitás, 1997). As DCRM são em princípio uma contra-indicação para o uso de valproato, fármaco que pode desencadear uma evolução fatal em alguns casos. À semelhança das doenças do ciclo da ureia, as doenças do metabolismo energético mitocondrial, como os défices da oxidação dos ácidos gordos ou da CRM, e em particular a síndrome de Alpers, devem ser consideradas um factor de risco para a insuficiência hepática induzida pelo valproato (Bicknese et al.1992; Leão, 1995; Delarue et al., 2000; Krähenbühl et al., 2000; Gordon, 2006). Ao contrário do expectável, o subgrupo das 45 crianças medicadas com anticonvulsivantes, e em particular o das 27 sob valproato, não teve acidúria orgânica, hiperlactacidémia, hiperalaninémia, hiperprolinémia, défices dos complexos da CRM (I no músculo, IV no músculo, I a V no músculo, I a V fígado e I a V no total dos tecidos)] ou diagnóstico de DCRM definida com maior frequência do que as restantes. Do mesmo modo, e ao contrário do que seria de esperar, não se detectou maior frequência de acidúria orgânica nos doentes investigados sob terapêutica com valproato.

A risperidona foi o mais usado dos antipsicóticos na nossa série. Este grupo de fármacos inibe o complexo I da CRM, o que estaria relacionado com os sintomas

extrapiramidais secundários (Maurer e Moller, 1997; Balijepalli et al., 2001; Sim et al., 2002; Modica-Napolitano et al., 2003; Casademont et al., 2007). No entanto, não se verificou correlação com significado estatístico entre o uso da risperidona e o défice do complexo I ou da CRM em geral neste grupo de doentes. Não pode descartar-se a hipótese de que em algum caso individual o défice do complexo I seja atribuível aos neurolépticos. A associação entre a toma de antipsicóticos e a ausência de acidúria orgânica pode dever-se ao facto de no subgrupo de doentes sob antipsicóticos haver predominantemente manifestações neurológicas crónicas sem envolvimento sistémico.

Vários antibióticos têm sido associados a toxicidade mitocondrial, nomeadamente sobre tecidos específicos (como por exemplo das cefalosporinas sobre o córtex renal) ou quando usados em altas concentrações (no caso das fluoroquinolonas e dos macrólidos) (Tune et al., 1988; Duewelhenke et al., 2007). A toxicidade dos aminoglicosídeos em indivíduos com a mutação A1555G do mtDNA (que altera a subunidade 12S do mtRNA ribosómico) devida à possível interacção daqueles fármacos com a CRM é a relação mais conhecida. A referida mutação associa-se a surdez não sindrómica, nomeadamente a induzida pelos antibióticos aminoglicosídeos (Estivill et al., 1998). No conjunto das nossas crianças, todos os casos de surdez neurosensorial (11) eram sindrómicos, pelo que não se considerou pertinente analisar uma eventual correlação com história de medicação com aminoglicosídeos.

Na nossa série os antibióticos foram usados no contexto de tratamento intensivo, em situações que colocavam diagnóstico diferencial com sepsis. De um modo geral, tratou-se de politerapia, incluindo cefalosporinas de terceira geração e aminoglicosídeos. Não foi demonstrada correlação entre o uso de antibióticos aquando da colheita de tecidos e sinais directos ou indirectos de alteração da CRM, excepto no que se refere à acidúria orgânica. De facto, esta foi mais frequente quando se usaram antibióticos ou se associaram três ou mais fármacos, o que poderá estar de acordo com a gravidade e o carácter multissistémico dos respectivos quadros clínicos. Os ácidos orgânicos urinários foram analisados em 14 dos 19 doentes sob antibioterapia, tendo sido anormais em cinco, com lactato, ácidos dicarboxílicos e/ou intermediários do ciclo de Krebs, isto é, sugestivos de um distúrbio mitocondrial funcional, em quatro.

A associação da toma de qualquer dos fármacos analisados com o défice da CRM e com o diagnóstico de DCRM definida e a correlação entre o uso de três ou mais medicamentos e o diagnóstico de DCRM definida, presença de ácidos orgânicos anormais ou de hiperprolinémia, poderia dever-se à gravidade dos quadros clínicos destes doentes, decorrentes da disfunção mitocondrial subjacente. No entanto, embora não se tivesse conseguido demonstrar correlação entre aquelas alterações e grupos específicos de fármacos, não se pode excluir que sejam secundárias. O facto de não ter havido relação entre a medicação e o carácter primário ou secundário da DCRM definida ou a presença de défices enzimáticos da CRM diminui aquela probabilidade.

Foi avaliado o possível efeito da anestesia a que os doentes foram submetidos para a realização da biópsia. A acção dos anestésicos, tanto locais como gerais, sobre a CRM tem sido objecto de numerosas publicações. (Chazotte e Vanderkooij, 1981; Miró et al., 1999a; Kam e Cardone, 2007). Os anestésicos locais são usados na execução de biópsias musculares em muitos hospitais, sobretudo de adultos. Os nossos doentes foram submetidos a anestesia geral, como referido em *Material e Métodos* (página 69). Num estudo prospectivo em humanos foi demonstrada inibição da oxidação mitocondrial de vários substratos pelos anestésicos gerais em músculo (Miró et al., 1999a). Os anestésicos voláteis como o halotano, os barbitúricos e o propofol inibem a CRM ao nível do complexo I, tal como foi documentado em estudos animais, usando frequentemente doses supra-terapêuticas (Hanley et al., 2002; Marik, 2004; Ohlson et al., 2004). O propofol foi recentemente associado a défice da COX, da citrato sintase e da oxidação dos ácidos gordos (Fodale e La Monaca, 2008). A *síndrome do propofol* (bradicardia com assistolia e um ou mais: acidose metabólica, rabdomiólise, hiperlipidémia e hepatomegália ou fígado gordo), que tem sido associada a infusão com doses elevadas e durante tempos muito prolongados daquele anestésico geral, é uma complicação rara, potencialmente fatal e mais frequente em crianças. Seria devida à diminuição do potencial de membrana com alteração do transporte dos electrões através da membrana interna da mitocôndria (Marik, 2004; Kam e Cardone, 2007). No entanto não é previsível que as baixas doses de propofol habitualmente usadas em anestesia durante curtos intervalos de tempo, como ocorreu nos doentes desta série, tenham um efeito significativo sobre a CRM. Todas estas crianças foram submetidas a anestesia geral, tal como os indivíduos que serviram como controlos normais do Laboratório. Admite-se por isso que a possível interferência dos fármacos usados na anestesia geral, embora reconhecida e não controlável, tenha sido mitigada pela universalidade do seu uso nestas circunstâncias.

As colheitas de tecidos *in vivo* ocorreram mais frequentemente de um modo programado, com sessão cirúrgica própria, do que aproveitando o tempo anestésico de outra cirurgia de que o doente necessitasse. A proporção de casos com outro diagnóstico foi maior nas colheitas programadas do que nas *oportunistas*, talvez devido a morbilidade mais acentuada (e portanto maior probabilidade de se encontrar umnexo causal) no grupo de doentes em que houve argumentos clínicos suficientes para programar a biópsia em tempo cirúrgico próprio. A associação entre colheita programada e DCRM definida e definida primária, défice da CRM no músculo e no total dos tecidos reforça a convicção de que a selecção dos doentes a submeter à biópsia foi criteriosa.

As condições de colheita, o intervalo de tempo até ao processamento laboratorial e as condições de armazenamento e de transporte são factores que devem ser bem controlados a fim de evitar falsos positivos. As amostras de músculo dos nossos doentes

destinadas a estudos a fresco foram imediatamente colocadas em meio adequado e transportadas para o Laboratório, a 10 minutos de distância do HP. As outras amostras foram imediatamente congeladas em neve carbónica no bloco operatório e transportadas ao Laboratório ou armazenadas em arca a -70°C durante um ou dois dias. Enquanto a citrato sintase e os complexos I a IV se mantiveriam relativamente estáveis a -70°C por longos períodos, tal não aconteceria com os complexos V e os segmentos I+III e II+III, mais sensíveis (Thorburn et al., 2004a).

A maior frequência de défice enzimático da CRM nas crianças com colheitas *post mortem* (eventualmente decorrente da gravidade inerente) deixa em aberto o papel das alterações associadas à morte. Em cerca de metade (48%) dos casos em que se efectuou os estudos com vista ao diagnóstico diferencial em material colhido *post mortem* chegou-se a um diagnóstico diferente do de DCRM. Contudo, quando se utilizou material biológico colhido *in vivo*, a percentagem de outros diagnósticos foi de apenas 14%. De facto, a gravidade da situação clínica (e não necessariamente a presença de sinais e sintomas muito sugestivos de DCRM) ditou a realização do estudo mitocondrial em muitos daqueles doentes. As possíveis alterações mitocondriais encontradas nos tecidos colhidos *post mortem*, eventualmente decorrentes do estado agónico e da morte e a sua influência no diagnóstico final devem ser bem ponderadas. Thorburn analisou a actividade dos complexos I a IV da CRM e da citrato sintase de amostras de fígado colhidas entre 2,5 e 14 horas após a morte e concluiu que os complexos II, II+III e III eram os que mostravam maior labilidade e que a actividade da citrato sintase se mantinha, mostrando os complexos I e IV uma vulnerabilidade intermédia (Thorburn et al., 2004a). Desse modo, quando uma amostra colhida *post mortem* mostra défice isolado do complexo II ou do complexo III, as deficiências da CRM mais raras, poder-se-ia questionar a sua validade (Rustin e Rotig, 2002; Bénit et al., 2009). Nos nossos doentes, a análise dos resultados da actividade enzimática daqueles complexos (II e III) nos homogeneizados de músculo e de fígado não mostrou diferenças significativas entre as amostras de tecido colhidas *in vivo* e as colhidas *post mortem*, o que corrobora a hipótese do papel da gravidade clínica no diagnóstico final.

6.3 As doenças mitocondriais na Região Centro de Portugal

O HP é o centro de referência de nível III para toda a Região Centro do País. Funciona também como centro de nível II para o distrito de Coimbra. A actual idade limite de admissão é 13 anos, que substituiu os 11 anos a partir de 2001. Em caso de doença crónica, os doentes já seguidos são de um modo geral assistidos até aos 18 anos.

Pode considerar-se que este estudo engloba praticamente todos os casos de suspeita de DCRM em crianças residentes na Região Centro de Portugal, cuja doença se manifestou clinicamente até aos 10 anos de idade. Partindo desse pressuposto, foi feita uma estimativa da incidência e da prevalência das DCRM na área de influência do HP. Dada a especificidade das DCRM e considerando o facto de haver apenas dois Laboratórios com capacidade de resposta diagnóstica na área das DCRM em Portugal, é compreensível que cerca de um quarto (24%) dos doentes estudados seja proveniente de fora da zona centro. Excluindo as crianças nascidas fora da Região Centro (16), os cálculos epidemiológicos basearam-se em 62 doentes.

A incidência de DCRM com manifestação clínica na primeira década de vida foi calculada como o quociente entre o número de crianças com DCRM e o número de nado-vivos na Região Centro de Portugal no período de 1989-1996 (oito anos): 1/6490. Este intervalo foi escolhido de modo a que todos os doentes tivessem atingido os 10 anos de idade no fim do período de estudo. Os dois primeiros anos do período de estudo foram excluídos por se considerar que não eram representativos da amostra, uma vez que os estudos mitocondriais estavam apenas a começar. Do mesmo modo, não foram obviamente incluídos na análise os casos nascidos antes de 1996 com clínica na primeira década de vida, falecidos antes do início do estudo. Pelas razões apontadas, esta estimativa da incidência das DCRM na Região Centro peca por defeito.

A opção por intervalos de tempo mais recentes (e necessariamente mais curtos) conduziu a valores mais elevados para a incidência: 1,8/10000 para o período entre 1991-1996 (6 anos) e 1,9/10000 para o período entre 1992 e 1996 (5 anos). A diferença traduz sem dúvida a maior alerta para estas patologias e a capacidade diagnóstica que se foi instalando ao longo do tempo.

Apesar de se tratar de doenças potencialmente graves em qualquer idade, há uma relação inversa entre a idade de início e a mortalidade, tal como foi demonstrado na nossa e em outras séries (Rubio-Gozalbo et al., 2000a; Debray et al., 2007b). Dada a elevada mortalidade na infância, a prevalência das DCRM abaixo dos 10 anos de idade é muito inferior à incidência, tal como se verificou nesta série.

Constituindo um grupo de doenças muito variadas e de critérios de diagnóstico mal definidos, os valores da incidência e da prevalência das DCRM são apenas estimativas. As revisões epidemiológicas publicadas nos últimos anos apontam para uma incidência das

DCRM entre 1:2000 e 1:5000 nado-vivos (Naviaux, 2004; Schaefer et al., 2004). O grupo de Melbourne estimou para a população Australiana uma prevalência das DCRM ao nascimento de 1:16129 na faixa etária abaixo dos 9-12 anos de idade e de 1:7634 na população em geral. Os valores apontados para outras populações diferem em função do tipo de selecção dos doentes, dos critérios de diagnóstico e do tipo de estudo em causa, sendo que a maioria é retrospectivo (Uusimaa et al., 2000; Darin et al., 2001; Sciacco et al., 2001; Castro-Gago et al., 2006; Miles et al., 2006). Em comparação com outras séries pediátricas, encontrou-se uma elevada incidência de DCRM com manifestação clínica antes dos 10 anos de idade (1:6490). Na parte ocidental da Suécia, a incidência de encefalomiopatas mitocondriais nos indivíduos com menos de 16 anos de idade foi calculada em 1:21227 e em 1:11000 nas crianças com idade pré-escolar (Darin et al., 2001). A estimativa de uma incidência de DCRM de 1: 69930 abaixo dos 16 anos de idade e de 1:35088 antes dos seis anos de idade, estimada para o noroeste de Espanha pelo grupo do Hospital Clínico Universitário de Santiago de Compostela baseou-se na experiência de um serviço de neuropediatria (Castro-Gago et al., 2006).

Embora a maioria das crianças com DCRM desta série tenha tido envolvimento do SNC durante a evolução, a selecção de doentes foi feita com base na suspeita de DCRM de qualquer tipo. Por outro lado, tanto na série sueca, como na espanhola, os critérios de diagnóstico usados foram diferentes dos adoptados no nosso estudo, pelo que é problemático fazer comparações. No entanto, tendo usado em princípio os mesmos critérios de diagnóstico que os do grupo de Melbourne, a incidência estimada para a população pediátrica da Região Centro de Portugal é cerca de 2,5 vezes mais elevada do que a da australiana (Skladal et al., 2003). Tal pode dever-se em parte a uma menor selectividade de inclusão no actual estudo. O grupo australiano recebe amostras de tecidos congelados de doentes de todo o país, sobretudo crianças (mais de 80% com menos de 15 anos), identificando défice enzimático *major* (complexos I a IV) em 22% dos casos (Thorburn et al., 2004a) Em contrapartida, no HP a taxa de detecção de défices *major* primários da CRM (excluindo os quatro casos de défice do complexo V) foi de 37%. Os doentes da nossa série estavam em geral gravemente afectados, o que se traduziu numa elevada taxa de mortalidade (30%). Uma proporção significativa de crianças (28%) estava criticamente doente aquando da investigação de DCRM, o que pode ter contribuído para a elevada percentagem de casos classificados como DCRM definida primária (39%), em comparação com dados publicados por outros grupos: 23 a 28% (Castelo et al., 2008; Munnich et al., 1996; Scaglia et al., 2004; Thorburn et al., 2004a). Apesar de se ter chegado a outro diagnóstico numa proporção não negligenciável de crianças (38 casos), algumas delas gravemente doentes e que vieram a falecer, muitas poderiam ter ficado sem diagnóstico se tivessem sido usados critérios de inclusão no estudo mitocondrial mais restritivos.

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Numa área tão vasta, heterogénea e ainda mal definida como é a da *medicina mitocondrial*, é habitual recorrer-se a análises retrospectivas, tal como a que se apresenta neste trabalho (Munnich et al., 1996; Nissenkorn et al., 1999; Darin et al. 2001; Sciacco et al., 2001; Sklaldal et al., 2003; Scaglia et al., 2004; Bohm et al., 2006; Castro-Gago et al., 2006; Debray et al., 2007). Assume-se este constrangimento, na certeza de estar a abrir caminho para estudos prospectivos em Portugal, seguramente mais úteis.

Os dados resultantes desta análise são dificilmente comparáveis com os de outras séries, devido não só a diferentes critérios de selecção dos doentes e abordagens diagnósticas variadas, como às características genéticas específicas da nossa população. É fundamental estabelecer critérios de diagnóstico, definição e classificação uniformes para as DCRM. Só então será possível conhecer a sua prevalência e história natural e organizar adequadamente os serviços de saúde e sociais para apoio aos doentes e famílias (Naviaux, 2004).

Este trabalho contribuiu para uma avaliação da importância das DCRM na patologia pediátrica no nosso País, através da estimativa da incidência e prevalência das mesmas na nossa Região.

A questão central que se coloca no final desta revisão é qual a investigação da CRM que se justifica manter ou retomar ou que outra deve ser proposta, de modo a que se disponha de um conjunto de exames coerente e adequado para a investigação de futuros casos.

As características de um centro de diagnóstico mitocondrial ideal foram delineadas por Thorburn e Smeitink: *fazer parte de um programa de diagnóstico (clínico e laboratorial) completo; investigar clinicamente todos os suspeitos de DCRM antes de avançar para estudo invasivos; estudar de preferência amostras de músculo a fresco; poder analisar outros tecidos de acordo com as indicações clínicas; integrar-se em programas de controlo de qualidade, nomeadamente para os estudos enzimáticos; trabalhar com protocolos clínicos e laboratoriais padronizados; dar resultados em menos de seis semanas, de preferência num só relatório; fazer parte de um consórcio de centros de diagnóstico mitocondrial; oferecer aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal; ter um programa de investigação próprio com recursos e capacidade técnica para fazer estudos moleculares avançados e/ou de biologia celular como a análise de híbridos* (Thorburn e Smeitink, 2001). A parceria estabelecida na última década entre o HP, os HUC e o Laboratório de Bioquímica Genética do CNC tem algumas daquelas características e potencialidade para desenvolver muitas das restantes. É ainda necessário um investimento real em meios humanos e técnicos que permita avanços na análise funcional do músculo a fresco e em fibroblastos e em estudos histológicos e de

genética molecular. Por outro lado, é importante reforçar a colaboração já existente com outros centros de investigação mitocondrial, não só em Portugal como no estrangeiro, de modo a estabelecer protocolos comuns e complementares.

7.1 Proposta de abordagem diagnóstica

A necessidade de estudos *a fresco*, a não computorização dos registos e a dificuldade de interpretação dos resultados levou a que os resultados da polarografia deixassem de ser incluídos no diagnóstico de rotina. Será de considerar a sua reintrodução com meios técnicos actualizados e a possibilidade de avaliação do controlo respiratório. A implementação do doseamento da CoQ, do estudo da oxidação dos substratos marcados com ^{14}C e da quantificação da produção de ATP devem ser equacionados neste contexto. É igualmente muito importante a determinação da actividade da piruvato-desidrogenase nas mesmas amostras de tecido e a par da dos complexos da CRM, tal como é prática de alguns grupos que investigam estas patologias (Caruso et al., 1996; Janssen et al., 2006a), uma vez que o défice da piruvato-desidrogenase é um dos diagnósticos diferenciais que mais frequentemente se coloca.

Como foi realçado ao longo deste trabalho, a abordagem dos doentes com suspeita de DCRM é muito variável, tendo dado origem a diversos algoritmos diagnósticos assentes em premissas comuns, isto é, a conjugação de elementos clínicos (em sentido lato), metabólicos, histológicos, funcionais da CRM e moleculares (Smeitink et al., 2003; Taylor et al., 2004; Debray et al., 2007b). Da experiência adquirida neste estudo e da revisão da literatura, elaborou-se um algoritmo diagnóstico para aplicação no estudo dos nossos doentes (figura 79 e tabela 37).

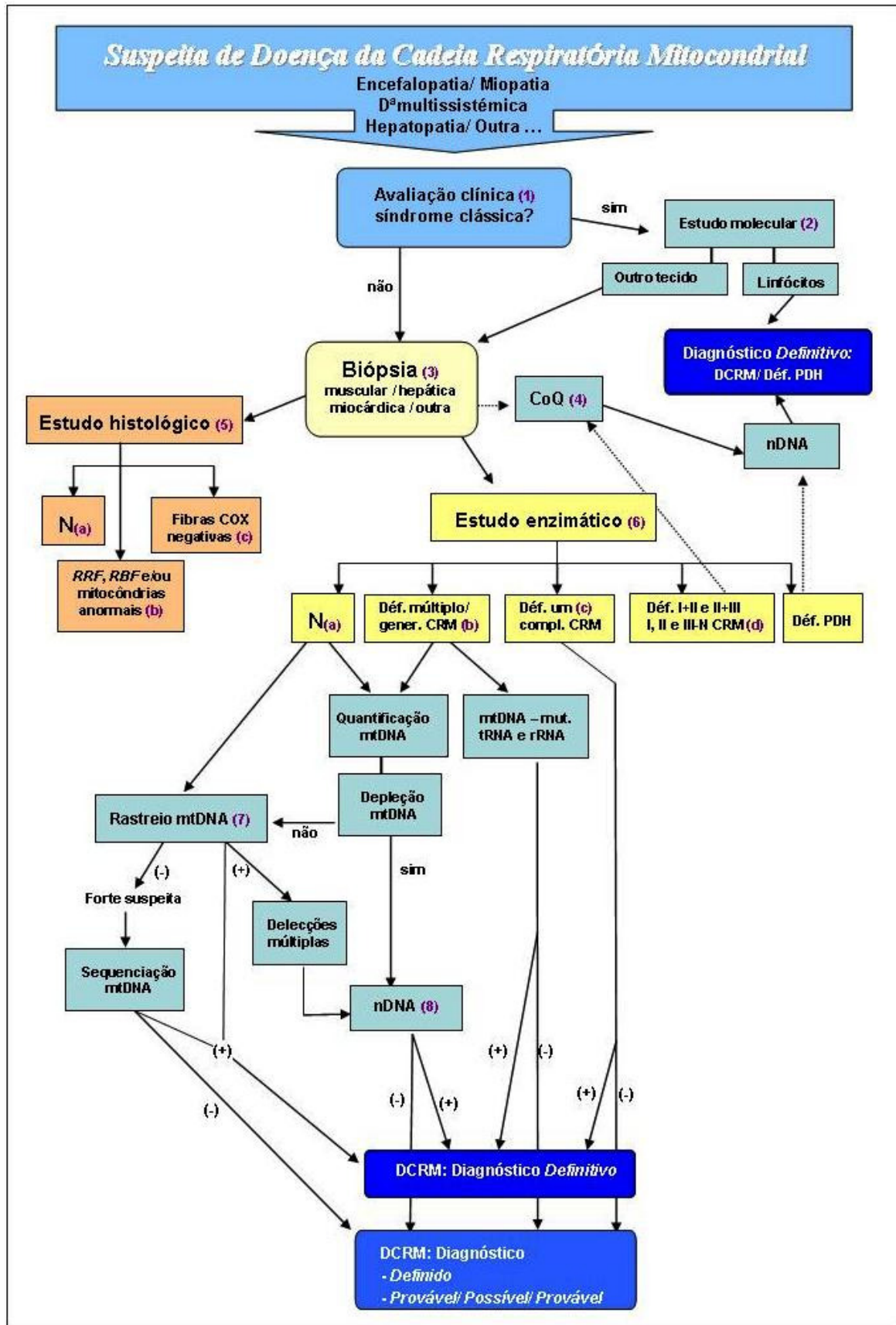


Figura 79 - DCRM na criança - algoritmo diagnóstico.

DCRM *definitiva* → clínica sugestiva + confirmação de alteração patogénica do mtDNA/ nDNA
 DCRM *improvável a definida* → de acordo com a escala de classificação proposta (página 215).

Tabela 37 - Algoritmo diagnóstico da DCRM na criança – notas

(1) Avaliação clínica
<ul style="list-style-type: none"> • Quadro clínico • História familiar Hereditariedade autossômica (a): consanguinidade e/ou irmão afectado → estudo do nDNA; Hereditariedade materna (m): doença na linha materna → estudo do mtDNA • Rastreo laboratorial: <i>redox</i> plasma, ácidos orgânicos urinários; lactato/piruvato <i>líquor</i>, provas de sobrecarga (teste de tolerância à glicose oral; exercício). • Rastreo de envolvimento multiorgânico (SNC e periférico, músculo, fígado, rim, coração, pâncreas, intestino, endócrino, medula óssea, visão, audição e pele). RMN cerebral / ¹HRMS → picos de lactato. <p>Conclusão: Síndrome conhecida / Indicação para biópsia (<i>critérios gerais</i> de Nijmegen)</p>
<p>Síndrome de Leigh</p> <p>mtDNA linfócitos (+++ História Familiar -hereditariedade materna e/ou retinopatia): mutações <i>NARP/Leigh</i> 8993; <i>MELAS</i> 3243, <i>MERRF</i> 8344</p> <p>Piruvato-desidrogenase (PDH) - linfócitos/ fibroblastos/ músculo/ fígado</p> <p>Biópsia músculo: piruvato desidrogenase, complexos CRM, histologia, CoQ, mtDNA.</p> <p>Défice IV → sequenciação do gene <i>SURF1</i>, <i>COX10</i>, <i>COX15</i>; mt <i>MTCO3</i> + miocardiopatia hipertrófica → sequenciação do gene <i>SCO2</i> ? variante franco-canadiana → sequenciação do gene <i>LRPPRC</i></p> <p>Défice I → mutações <i>ND2</i>, <i>ND3</i>, <i>ND5</i> e <i>ND6</i> mtDNA; <i>NDUFV1</i> <i>NDUFS1,3,4,7</i> e <i>8</i> <i>NDUFA2</i> <i>C8ORF38</i> nuclear</p> <p>Défice V → mt<i>ATP6</i></p> <p>Défice II → <i>flavoprotein subunit A</i> (<i>SDHA</i>)</p> <p>Défice III → <i>BCS1L</i> <i>assembling</i></p> <p>Défices múltiplos → genes mtDNA envolvidos na síntese proteica (tRNA e rRNA).</p> <p>Se estudo anterior inconclusivo, considerar:</p> <p>→ doseamento da Piruvato-carboxilase (linfócitos, fibroblastos, fígado, músculo...) sobretudo se acidose láctica (± hipoglicémia, hiperamoniémia, citrulinémia e hiperlisinémia)</p>
<p>Encefalopatia de causa x ou doença multissistémica com envolvimento neurológico:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Alpers clássica: → mutação A467T do gene <i>POLG1</i>; se negativo → sequenciação <i>POLG1</i> • Sem critérios de S. Alpers → quantificação mtDNA em músculo (fígado); se depleção → sequenciação <i>POLG1</i>
<p>Hepatopatia /Insuficiência hepática de causa x</p> <p>Considerar* → quantificação mtDNA em fígado (de preferência) ou músculo; se depleção → estudo dos genes <i>DGUOK</i>, <i>POLG1</i>... (ver ponto 8)</p> <p>(*sobretudo se hiperlactacidémia persistente e/ou encefalopatia)</p>

DCRM na criança: algoritmo diagnóstico – notas (continuação)

(2) Estudo molecular

→ **mtDNA:**

Leigh/ *NARP* (± hipocitrulinémia), *LHON*, *MERRF*, *MELAS* → linfócitos

Pearson, *KSS*, *MELAS*, Alpers → músculo

→ **nDNA** (linfócitos):

Barth → (doseamento cardioplipina) *TAZ*.

MNGIE → (> timidina e desoxiguanosina plasma) *TP*.

Alpers, *SANDO*, *SCAE*, *CPEO* autossômica dominante/recessiva, esporádica → *POLG1*.

SANDO → *Twinkle* (*C10orf2*).

CPEO autossômica dominante → *ANT1*, *Twinkle*.

Sangers → (depleção) *ANT1*.

(3) Biópsia

- Músculo, fígado ... (de preferência, órgão/tecido afectado).
- Considerar biópsia de pele (cultura de fibroblastos) – sobretudo casos potencialmente fatais.
- Considerar necrópsia.

(4) Doseamento de CoQ

Em músculo (e/ou fibroblastos), sempre que possível (défices 2^{os}), sobretudo se:

- Ataxia/ atrofia cerebelosa, nefropatia, miocardiopatia e/ou miopatia.
- Leigh com atraso de crescimento.

Défice de I+III e II+III com I, II e III –N

(5) Histologia

Histoquímica: Hematoxilina-Eosina (HE); Tricrómio Gomori; *Periodic Acid-Schiff* (PAS); *Oil Red O*.

Histoenzimologia:

- ATPase pH 4.35 e 9.4; Citocromo oxidase (COX).
- Nicotinamida Adenina Dinucleótido - Tetrazolium Reductase (NADH-TR).
- Succinato-desidrogenase (SDH) e SDH modificada.

Microscopia electrónica: Sempre que possível

(5a) Não exclui DCRM → Orientação de acordo com clínica e estudo enzimático.

(5b) RRF- Fibras Vermelhas Rotas e/ou **RBF-**Fibras Azuis Rotas e/ou mitocôndrias anormais

→ > probabilidade de alt. (1^{as} ou 2^{as}) mtDNA → quantificação/ rastreio de acordo com a clínica.

→ considerar estudo nDNA, de acordo com a clínica.

(5c) Fibras **COX negativas** - Padrão: heterogéneo → mtDNA; homogéneo → nDNA.

DCRM na criança: algoritmo diagnóstico – notas (continuação)

(6) Estudos enzimáticos

Em homogeneizado de **músculo** (fresco/congelado) ou **outro tecido** (**fígado**, rim ...):

- Complexos I-V; Segmentos I+III e II+III; Piruvato-desidrogenase.

(6a) Sem défices enzimáticos identificados:

- Rever critérios gerais de Nijmegen para DCRM.
- Considerar biópsia de outro tecido (fígado, se estudo músculo normal)
- Considerar outras causas de défice energético 1º ou 2º, por exemplo: défice da piruvato desidrogenase, da oxidação dos ácidos gordos, da biotinidase, da piruvato carboxilase.
- Se forte suspeita clínica → estudo mtDNA/nDNA

(6b) Défices enzimáticos múltiplos/ generalizados:

- Considerar depleção mtDNA
- Considerar mutações do mtDNA que afectam a síntese proteica.

(6c) Défice de um complexo enzimático da CRM:

→ **estudo do nDNA/ mtDNA de acordo com a clínica/ défice enzimático:**

[hereditariedade autossómica (a); materna (m)]

Ia → *NDUFS1,2,3,4,6, 7 e 8; NDUFV1 e 2*

Im → *ND1,2,3,4,4L,5 e 6*

II → *SDHA, B, C e D*

IIIa → *BCS1L, UQ-P*

IIIIm → *Cyt b*

IVm → *COX I, II e III* (fibras COX negativas- perfil heterogéneo)

IVa → *COX 10 e 15; SCO1 e 2, SURF1, LRPPRC* (fibras COX negativas- perfil homogéneo)

Va → *ATP11,12; ATP a, b e g*

Vm → *ATPase 6 e 8*

(6d) Défice de I+III e II+III com I, II e III –N → Dosear CoQ (ver ponto 4)

(7) Rastreio mtDNA

Mutações mais frequentes e grandes deleções (Shouthern blot + L-PCR). (ver em Anexos, página 257)

Se positivo → quantificar heteroplasmia

se deleções múltiplas → estudo da nDNA (comunicação intergenómica)

Se negativo e forte suspeita clínica e laboratorial → considerar sequenciação do mtDNA

se alteração → confirmação e quantificação da heteroplasmia

(8) Defeitos da comunicação intergenómica

- **Hepatocerebral:** *DGUOK, POLG1, MPV17;*
- **Miopatia/Encefalopatia:** *POLG1; TK2; SUCLA2, ANT1 Twinkle;*
- **Encefalomiopático/ Multissistémico:** *POLG1; TP*

7.2 Proposta de uma escala de classificação

Com base na análise retrospectiva apresentada e tendo em conta os recursos locais actualmente disponíveis, nomeadamente em termos de capacidade de investigação laboratorial de rotina da CRM, propõe-se uma escala diagnóstica, baseada na de Nijmegen, a aplicar no HP. Esta classificação baseia-se numa tabela de dupla entrada com os *critérios clínico-laboratoriais gerais* adaptados de Nijmegen, escalonados de um a quatro (improvável, possível, provável e definido) e os resultados dos estudos enzimáticos da CRM *normalizados* para a citrato sintase, em percentagem da média do v.r. Uma vez que não se dispõe dos outros critérios bioquímicos usados por aquele grupo (oxidação de substratos ¹⁴C e síntese de ATP/ fosfocreatina), os resultados dos estudos enzimáticos da CRM são distribuídos por quatro subgrupos: superior ou igual a 40%, de 30 a 40%, de 20 a 30% e inferior a 20% da média do v.r., correspondentes ao grau de improvável, possível, provável e definido, respectivamente (tabela 38).

Tabela 38 - Escala diagnóstica de DCRM proposta.

	DCRM	Critérios clínico-laboratoriais gerais			
		Improvável	Possível	Provável	Definida
Actividade Enzimática da CRM	Improvável ≥ 40%	Improvável	Improvável	Possível	Possível
	Possível ≥30 - <40	Improvável	Possível	Possível	Provável
	Provável ≥20 - <30	Possível	Possível	Provável	Definida
	Definida <20%	Possível	Provável	Definida	Definida

O grau de certeza diagnóstica é obtido através de uma tabela de dupla entrada:

→ **Critérios clínico-laboratoriais gerais.**

Cada uma das três secções (clínica, metabólica/ neurorradiológica e morfológica) é pontuada de 0 a 4.

Total: 8-12 → Definida; 5-7 → Provável; 2-4 → Possível; 1 → Improvável (Wolf e Smeitink, 2002).

→ **Actividade enzimática de um ou mais complexos da CRM:**

<20% → Definida; ≥20 e <30 → Provável; ≥30 e <40 → Possível; ≥ 40% → Improvável.

Considera-se haver défice da CRM quando pelo menos um dos complexos enzimáticos apresenta actividade inferior a 40% da média do v.r. *normalizada* para a citrato sintase

(Grazina, 2004; DiMauro, 2009 - comunicação pessoal). Através da tabela de dupla entrada com os critérios clínicos e bioquímicos, pontua-se os cruzamentos de um modo mais restritivo do que na escala de Nijmegen (a favor dos *critérios gerais* quando haja discordância), de modo a não sobrevalorizar os resultados do estudo enzimático. A identificação de uma alteração patogénica do mtDNA ou do nDNA, associada a clínica sugestiva, com ou sem alteração da função mitocondrial nos tecidos estudados, faz o diagnóstico de DCRM definida ou melhor, definitiva.

Aplicou-se a classificação proposta e a de Bernier, adaptada pela subtracção dos critérios moleculares, à amostra dos 198 doentes com estudo enzimático da CRM da nossa série. Como se pode observar na tabela 39a e b, as diferenças entre a classificação proposta e a de Bernier (sem o estudo molecular) não são maiores em termos absolutos do que as existentes entre a escala de Bernier (adaptada pela dedução dos critérios funcionais da CRM e moleculares) e a dos *critérios gerais* de Nijmegen.

Tabela 39 - Comparação da escala de diagnóstico proposta com outras escalas de DCRM.

(a)	Be [#] versus C ^a	
	n ^o	%
Be>>C ^a	1	0,5
Be>C ^a	55	28
Be=C ^a	108	55
Be<C ^a	34	17
Be<<C ^a	0	0
Total	198	100

sem molecular.

(b)	Be* versus Nj	
	n ^o	%
Nj>>Be	10	5
Nj>Be	81	41
Nj=Be	81	41
Nj<Be	24	12
Nj<<Be	2	1
Total	198	100

* sem enzimático nem molecular.

Classificação diagnóstica com as três escalas em discussão em 198 doentes da nossa série com investigação enzimática da CRM. (a) segundo a classificação proposta (C^a) em cotejo com a escala de Bernier, adaptada pela exclusão dos critérios moleculares (Be[#]); (b) segundo a aplicação dos *critérios gerais* de Nijmegen (Nj), em comparação com a escala de Bernier, adaptada pela exclusão dos resultados enzimático e de genética molecular (Be*).

= doentes que ficam com a mesma classificação em qualquer das escalas; > ou < doentes cuja classificação difere de um ponto nos quatro possíveis; >> ou << doentes cuja classificação difere de dois pontos nos quatro possíveis.

Por outro lado, a análise de concordância entre a escala proposta (C^a) e a de Bernier sem o estudo molecular, subdividindo a amostra em DCRM definida e DCRM não definida mostrou um valor muito superior ($Kappa=0,54$) ao obtido na comparação entre a escala de Bernier sem o estudo enzimático e molecular e a dos *critérios gerais* de Nijmegen ($Kappa \sim 0,05$).

A opção por esta metodologia de diagnóstico permite adoptar os critérios gerais de Nijmegen (validados por estudos moleculares) e fazer uma selecção mais rigorosa dos doentes para biópsia, escalonando-os de 0 a 8, de acordo com a pontuação obtida com os critérios clínicos e metabólicos/ imagiológicos. Posteriormente, entrando em linha de conta com os resultados histológicos, será possível atribuir-lhes a pontuação de 0 a 12, agrupá-los nas quatro referidas categorias e cruzar esta informação com os resultados do estudo funcional enzimático da CRM.

Na classificação que se propõe, os casos com actividade enzimática inferior a 20% da média do v.r. (definido) só serão considerados DCRM definida se pontuarem 3 ou 4 (provável ou definido) na vertente clínico-laboratorial geral. A grande diferença em relação à classificação de Bernier é que os doentes com estudo enzimático da CRM normal só serão classificados como definidos se for demonstrada uma mutação patogénica (neste caso, definitivos), mesmo que tenham um critério clínico *major*. A tónica será assim colocada na importância da clínica e do estudo funcional da cadeia respiratória como orientadores da investigação molecular.

Apesar da maior frequência das mutações do nDNA na criança, o estudo completo do mtDNA numa fase relativamente precoce da investigação etiológica é susceptível de uma relação custo/ benefício adequada, na medida em que pode orientar para uma causa nuclear, ao serem detectadas alterações sugestivas de um défice da comunicação intergenómica ou excluídas mutações causais no mtDNA.

A colaboração com o Laboratório de Bioquímica Genética do CNC no sentido da implementação de metodologias de avaliação funcional que permitam adoptar uma escala diagnóstica semelhante à de Nijmegen é um dos nossos objectivos a cumprir num futuro próximo. Outro aspecto ainda mais premente é o crescimento da capacidade diagnóstica em termos de análises de genética molecular da CRM, numa colaboração em rede com Centros de Investigação e Diagnóstico nacionais e estrangeiros.

7.3 O seguimento dos doentes – adopção de um protocolo internacional

Se o diagnóstico das DCRM é complexo, a terapêutica específica tem sido considerada uma *missão impossível*. Nos primeiros anos do período do estudo, adoptou-se um protocolo de tratamento que consistia numa associação de riboflavina, ácido ascórbico, α -tocoferol, ubiquinona/idebenona e carnitina, prescrita em todos os casos de DCRM confirmada ou fortemente suspeita. Se em alguns doentes houve alguma resposta clínica, ela foi transitória e raramente justificou a manutenção da terapêutica a longo prazo, tal como de resto foi sendo referido na literatura (Mathews et al., 1993; Bindoff, 1999; Chinnery e Turnbull, 2001). As terapias propostas, frequentemente com bases fisiopatológicas fundamentadas e ocasional tradução bioquímica favorável mas sem a correspondente tradução clínica, continuam a ser controversas, requerendo muita investigação e alguma esperança (Kubota et al., 2004; Marriage et al., 2004; Kornblum et al., 2005; DiMauro et al., 2006; Rodriguez et al., 2007; DiMauro e Rustin, 2009). A objectivação dos resultados das várias abordagens terapêuticas passa por uma definição adequada das DCRM e conhecimento da sua história natural.

O grupo de Newcastle publicou uma escala semi-quantitativa para avaliação e seguimento de pacientes com DCRM em duas versões, uma para aplicação em crianças (Phoenix et al., 2006) e outra, em adultos (Schaefer et al., 2006), com vista a estabelecer a história natural das DCRM e avaliar futuras intervenções terapêuticas: *Newcastle Pediatric/Adult Mitochondrial Disease Scale*. O nosso objectivo é passar a aplicar a escala pediátrica nos doentes seguidos no HP. Após contacto com os autores e com a sua permissão, fez-se a sua adaptação para português (ver Anexos, tabelas 47-49, páginas 275 - 282).

CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absalon MJ, Harding CO, Fain DR, Li L, Mack KJ. Leigh syndrome in an infant resulting from mitochondrial DNA depletion. *Pediatr Neurol* 2001; 24:60-3.
- Allen RJ, DiMauro S, Coulter DL, Papadimitriou A, Rothenberg SP. Kearns–Sayre syndrome with reduced plasma and cerebrospinal fluid folate. *Ann Neurol* 1983;13: 679–82.
- Alberio S, Mineri R, Tiranti V, Zeviani M. Depletion of mtDNA: syndromes and genes. *Mitochondrion* 2007; 7:6-12.
- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM. Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 1999; 8:743-9.
- Almeida D, Diogo L, Garcia P, Grazina M, Silva E, Tavares Almeida I, et al. From migraine to mitochondrial respiratory chain disease [abstract]. *J Inher Metab Dis* 2004; 27(1 Suppl): 114S.
- American Psychiatric Association. Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais. Lisboa: Climepsi, 2002.
- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 829-40.
- Angelin A, Bonaldo P, Bernardi P. Altered threshold of the mitochondrial permeability transition pore in Ullrich congenital muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777: 893-6.
- Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, et al. Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2003; 72:101-14.
- Appaix F, Minatchy M, Riva-Lavieille C, Olivares J, Antonsson B, Saks VA. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1457:175-81.
- Arenas J, Martín MA. Metabolic intolerance to exercise. *Neurologia* 2003; 18: 291-302.
- Argov Z. Functional evaluation techniques in mitochondrial disorders. *Eur Neurol* 1998; 39: 65-71.
- Artuch R, Pineda M, Vilaseca MA, Briones P, Ribes A, Colomer J, et al. Respiratory chain and pyruvate metabolism deficiencies in pediatric patients: evaluation of biochemical tests for selective screening. *Rev Neurol* 1998a; 26:38-42.
- Artuch R, Pavía C, Playán A, Vilaseca MA, Colomer J, Valls C, et al. Multiple endocrine involvement in two pediatric patients with Kearns-Sayre syndrome. *Horm Res* 1998b; 50:99-104.
- Artuch R, Brea-Calvo G, Briones P, Aracil A, Galván M, Espinós C, et al. Cerebellar ataxia with coenzyme Q10 deficiency: diagnosis and follow-up after coenzyme Q10 supplementation. *J Neurol Sci* 2006; 246:153-8.
- Atkuri KR, Cowan TM, Kwan T, Ng A, Herzenberg LA, Herzenberg LA, et al. Inherited disorders affecting mitochondrial function are associated with glutathione deficiency and hypocitrullinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:3941-5.
- Aure K, Benoist JF, Ogier de Baulny H, Romero NB, Rigal O, Lombes A. Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology* 2004; 63:727-9.
- Ausubel FM, Albright LM, Slatko BE, Eckert RL, Heinrich P, Nixon BT, et al. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. John Wiley & Sons, 1997: 7.0.1-7.7.23.

- Bai RK, Perng CL, Hsu CH, Wong LJ. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011:304-9.
- Baillie TA. Metabolism of valproate to hepatotoxic intermediates. *Pharm Weekbl Sci* 1992; 14:122-5.
- Baker MJ, Frazier AE, Gulbis JM, Ryan MT. Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol.* 2007; 17:456-64.
- Balijepalli S, Kenchappa RS, Boyd MR, Ravindranath V. Protein thiol oxidation by haloperidol results in inhibition of mitochondrial complex I in brain regions: comparison with atypical antipsychotics. *Neurochem Int* 2001; 38:425-35.
- Banchs I, Casasnovas C, Montero J, Martínez-Matos JA, Volpini V. Two Spanish families with Charcot-Marie-Tooth type 2A: clinical, electrophysiological and molecular findings. *Neuromuscul Disord* 2008; 18:974-8.
- Barclay AR, Sholler G, Christodolou J, Shun A, Arbuckle S, Dorney S, et al. Pulmonary hypertension-a new manifestation of mitochondrial disease. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28:1081-9.
- Barschak AG, Ferreira Gda C, André KR, Schuck PF, Viegas CM, Tonin A, et al. Inhibition of the electron transport chain and creatine kinase activity by ethylmalonic acid in human skeletal muscle. *Metab Brain Dis* 2006; 21:11-9.
- Barth PG, Wanders RJ, Vreken P, Janssen EA, Lam J, Baas F. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome) (MIM 302060). *J Inherit Metab Dis* 1999; 22:555-67.
- Barth PG, Valianpour F, Bowen VM, Lam J, Duran M, Vaz FM, et al. X-linked cardioskeletal myopathy and neutropenia (Barth syndrome): an update. *Am J Med Genet A* 2004; 126:349-54.
- Baumgartner ER, Suormala TM, Wick H, Probst A, Blauenstein U, Bachmann C, et al. Biotinidase deficiency: a cause of subacute necrotizing encephalomyelopathy (Leigh syndrome). Report of a case with lethal outcome. *Pediatr Res* 1989; 26:260-6.
- Benca J, Ondrusova A, Huttova M, Rudinsky B, Kisac P, Bauer F. Neuroinfections due to *Enterococcus faecalis* in children. *Neuro Endocrinol Lett* 2007; 28 Suppl 2:32-3.
- Bendahan D, Mattei JP, Guis S, Kozak-Ribbens G, Cozzone PJ. Non-invasive investigation of muscle function using ³¹P magnetic resonance spectroscopy and ¹H MR imaging. *Rev Neurol (Paris)* 2006; 162:467-84.
- Bénit P, Beugnot R, Chrétien D et al. Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mut* 2003; 21: 582-6.
- Bénit P, Goncalves S, Philippe Dassa E, Brière JJ, Martin G, Rustin P. Three spectrophotometric assays for the measurement of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clin Chim Acta* 2006; 374:81-6.
- Bénit P, Lebon S, Rustin P. Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:181-5.
- Beretta S, Mattavelli L, Sala G, Tremolizzo L, Schapira AH, Martinuzzi A, et al. Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain* 2004; 127: 2183-92.
- Berger A, Mayr JA, Meierhofer D, Fötschl U, Bittner R, Budka H, et al. Severe depletion of mitochondrial DNA in spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol* 2003; 105:245-51.
- Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002; 59:1406-11.
- Bicknese AR, May W, Hickey WF, Dodson WE. Early childhood hepatocerebral degeneration misdiagnosed as valproate hepatotoxicity. *Ann Neurol* 1992; 32:767-75.

- Bindoff L. Treatment of mitochondrial disorders: practical and theoretical issues. *Eur J Paed Neurol* 1999; 3:201-8.
- Bindoff L. Mitochondrial gastroenterology. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 143-159.
- Blanco-Barca O, Pintos-Martínez E, Alonso-Martín A, Escribano-Rey MD, Campos-González Y, Arenas-Barbero J, et al. Mitochondrial encephalomyopathies and West's syndrome: a frequently underdiagnosed association. *Rev Neurol* 2004; 39:618-23.
- Boddaert N, Romano S, Funalot B, Rio M, Sarzi E, Lebre AS, et al. 1H MRS spectroscopy evidence of cerebellar high lactate in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Mol Genet Metab* 2008; 93:85-8.
- Bodemer C, Rötig A, Rustin P, Cormier V, Niaudet P, Saudubray JM, et al. Hair and Skin Disorders as Signs of Mitochondrial Disease. *Pediatrics* 1999; 103 Suppl 2: 428-33.
- Boitier E, Degoul F, Desguerre I, Charpentier C, Francois D, Ponsot G, et al. A case of mitochondrial encephalomyopathy associated with a muscle coenzyme Q10 deficiency. *J Neurol Sci* 1998; 156:41-6.
- Bohm M, Pronicka E, Karczmarewicz E, Pronicki M, Piekutowska-Abramczuk D, Sykut-Cegielska J, et al. Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. *Pediatr Res* 2006;59:21-6.
- Boles RG, Williams JC. Mitochondrial disease and cyclic vomiting syndrome. *Dig Dis Sci* 1999; 44:103-107.
- Bonnefont JP, Saudubray JM, Vassault A. Dosage des acides lactique, pyruvique et des corps cétoniques. Application au diagnostic des hyperlactacidémies et des états d'acidocétose chez l'enfant. In: Saudubray JM ed. *Maladies métaboliques. Progrès en Pédiatrie* 8. Paris: Doin Éditeurs, 1991: 29-40.
- Boulet L, Karpatis G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992; 51:1187-200.
- Bourgeois JM, Tarnopolsky MA. Pathology of skeletal muscle in mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 2004; 4:441-52.
- Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, et al. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995; 11:144-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* 2002; 360: 219-23.
- Brenner C, Marzo I, Kroemer GA. Revolution in apoptosis: from a nucleocentric to a mitochondriocentric perspective. *Exp Gerontol* 1998; 33:543-53.
- Brierley EJ, Johnson MA, James OF, Turnbull DM. Effects of physical activity and age on mitochondrial function. *QJM* 1996; 89:251-8.
- Brinkman K, Smeitink JA, Romijn JA, Reiss P. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 1999; 354:1112-5.
- Briones P, Vilaseca MA, García-Silva MT, Pineda M, Colomer J, Ferrer I, et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG) may be underdiagnosed when mimicking mitochondrial disease. *Eur J Paediatr Neurol* 2001; 5:127-31.

- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C817-33.
- Brown MD, Torroni A, Shoffner JM, Wallace DC. Mitochondrial tRNA (Thr) mutations and lethal infantile mitochondrial myopathy. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 446-447.
- Brown MD, Sun F, Wallace DC. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet* 1997; 60:381-7.
- Brown DT, Herbert M, Lamb VK, Chinnery PF, Taylor RW, Lightowlers RN, et al. Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the future. *Lancet* 2006; 368:87-9.
- Bruno C, Minetti C, Tang Y, Magalhaes PJ, Santorelli FM, Shanske S, et al. Primary adrenal insufficiency in a child with a mitochondrial DNA deletion. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21:155-61.
- Calvaruso MA, Smeitink J, Nijtmans L. Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation. *Methods* 2008; 46:281-7.
- Campos Y, Martín MA, Rubio JC, Solana LG, García-Benayas C, Terradas JL, et al. Leigh syndrome associated with the T9176C mutation in the ATPase6 gene of mitochondrial DNA. *Neurology* 1997; 49:595-7.
- Capute AJ, Accardo PJ. An Introduction to Developmental Pediatrics. In: Capute AJ, Accardo PJ, editors. *Development Disabilities in Infancy and Childhood*. London: Paul H Brookes Co, 1991:1-3.
- Castelo R, Garcia P, Vasconcelos M, Rebelo O, Dinis A, Grazina M, et al. Acute necrotizing encephalopathy – a mitochondrial disorder? [abstract]. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(1 Suppl): 61S.
- Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiol Aging* 2004; 25:105-10.
- Carelli V. Leber's Hereditary Optic Neuropathy. In: Schapira AHV e DiMauro S, editors. *Mitochondrial Disorders in Neurology*. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann Ltd, 2002: 115-42.
- Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Genet* 2003; 19:257-62.
- Carelli V, Barboni P, Sadun AA. Mitochondrial ophthalmology. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006:105-42.
- Carmi E, Defossez C, Morin G, Fraïtag S, Lok C, Westeel PF, et al. MELAS syndrome (mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes. *Ann Dermatol Venereol* 2001; 128:1031-5.
- Carrozzo R, Bornstein B, Luciola S, Campos Y, de la Pena P, Petit N, et al. Mutation analysis in 16 patients with mtDNA depletion. *Hum Mutat* 2003; 21:453-4.
- Carrozzo R, Piemonte F, Tessa A, Luciola S, Rizza T, Meschini MC, et al. Infantile mitochondrial disorders. *Biosci Rep* 2007; 27:105-12.
- Caruso U, Adami A, Bertini E, Burlina AB, Carnevale F, Cerone R, et al. M Respiratory-chain and pyruvate metabolism defects: Italian collaborative survey on 72 patients. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19:143-148.
- Casademont J, Perea M, López S, Beato A, Miró O, Cardellach F. Enzymatic diagnosis of oxidative phosphorylation defects on muscle biopsy: better on tissue homogenate or on a mitochondria-enriched suspension? *Med Sci Monit* 2004; 10:CS49-53.
- Casademont J, Garrabou G, Miró O, López S, Pons A, Bernardo M, et al. Neuroleptic treatment effect on mitochondrial electron transport chain: peripheral blood mononuclear cells analysis in psychotic patients. *J Clin Psychopharmacol* 2007; 27:284-8.

- Casali C, Fabrizi GM, Santorelli FM, Colazza G, Villanova M, Dotti MT, et al.. Mitochondrial G8363A mutation presenting as cerebellar ataxia and lipomas in an Italian family. *Neurology* 1999; 52:1103–4.
- Castro-Gago M, Alonso A, Pintos-Martínez E, Beiras-Iglesias A, Campos Y, Arenas J, et al. Congenital hydranencephalic-hydrocephalic syndrome associated with mitochondrial dysfunction. *J Child Neurol* 1999; 14:131-5.
- Castro-Gago M, Alonso A, Pintos-Martínez E, Novo-Rodríguez MI, Blanco-Barca MO, Campos Y, et al. Multiple symmetric lipomatosis associated to polyneuropathy, atrophy of the cerebellum and mitochondrial cytopathy. *Rev Neurol* 2003; 36:1026–9.
- Castro-Gago M, Blanco-Barca MO, Campos-González Y, Arenas-Barbero J, Pintos-Martínez E, Eirís-Puñal J. Epidemiology of pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in northwest Spain. *Pediatr Neurol* 2006; 34:204-11.
- Chabi B, Mousson de Camaret B, Duborjal H, Issartel JP, Stepien G. Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: application to diagnosis. *Clin Chem* 2003; 49:1309-17.
- Chacinska A, Rehling P. Moving proteins from the cytosol into mitochondria. *Biochem Soc Trans* 2004; 32:774-6.
- Chariot P, Ratiney R, Ammi-Said M, Hérigault R, Adnot S, Gherardi R. Optimal handling of blood samples for routine measurement of lactate and pyruvate. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118:695-7
- Chawla S, Coku J, Forbes T, Kannan S. Kearns-Sayre syndrome presenting as complete heart block. *Pediatr Cardiol* 2008; 29: 659-62.
- Chazotte B, Vanderkooi G. Multiple sites of inhibition of mitochondrial electron transport by local anesthetics. *Biochim Biophys Acta* 1981; 636:153-61.
- Chi CS, Mak SC, Shian WJ, Chen CH. Oral glucose lactate stimulation test in mitochondrial diseases. *Pediatr Neurol* 1992; 8: 445-9.
- Chicco AJ and Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: 33-44.
- Chi CS, Mak SC, Shian WJ, Chen CH. Oral glucose lactate stimulation test in mitochondrial disease. *Pediatr Neurol* 1992; 8: 445-9.
- Chinnery PF, Howell N, Andrews RM, Turnbull DM. Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity. *J Med Genet* 1999; 36:505-10.
- Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, et al. The Epidemiology of Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations. *Ann Neurol* 2000; 48: 188-193.
- Chinnery PF, Turnbull DM. Epidemiology and Treatment of Mitochondrial Disorders. *Am J Med Genet* 2001; 106: 94-101.
- Chinnery PF. New approaches to the treatment of mitochondrial disorders. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:16-23.
- Chinnery PF, Schon EA. Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74: 188-99.
- Chinnery PF, Bindoff LA. 116th ENMC international workshop: the treatment of mitochondrial disorders. *Neuromuscul Disord* 2003; 13:757-64.
- Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, et al. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 2004; 364:592–595.

- Chinnery P, Majamaa K, Turnbull D, Thorburn D. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2006a; (1):CD004426
- Chinnery P, Griffiths TD. Mitochondrial otology. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006b:162-77.
- Chitturi MD, George PD. Hepatotoxicity of commonly used drugs: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antihypertensives, antidiabetic agents, anticonvulsants, lipid lowering agents, psychotropic drugs. *Semin Liver Dis* 2002; 2:169-184.
- Chou SM. Megaconial mitochondria observed in a case of chronic polymyositis. *Acta Neuropathol* 1968; 12:68-89.
- Chou YJ, Ou CY, Hsu TY, Liou CW, Lee CF, Tso DJ, et al. Prenatal diagnosis of a fetus harbouring an intermediate load of the A3243G mtDNA mutation in a maternal carrier diagnosed with MELAS syndrome. *Prenat Diagn* 2004; 24: 367-370.
- Chow CW, Thorburn DR. Morphological correlates of mitochondrial dysfunction in children. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 2:68-78.
- Chrétien D, Rustin P, Bourgeron T, Rötig A, Saudubray JM, Munnich A. Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clin Chim Acta* 1994; 228:53-70.
- Chrétien D, Gallego J, Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Munnich A, et al. Biochemical parameters for the diagnosis of mitochondrial respiratory chain deficiency in humans, and their lack of age-related changes. *Biochem J* 1998; 329:249-54.
- Chrétien D, Rustin P. Mitochondrial oxidative phosphorylation: pitfalls and tips in measuring and interpreting enzyme activities. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26:189-98.
- Chrétien D, Bénit P, Chol M, Lebon S, Rötig A, Munnich A, et al. Assay of mitochondrial respiratory chain complex I in human lymphocytes and cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301:222-4.
- Clough JR. Energy metabolism during mammalian embryogenesis. *Biochem Soc Trans* 1985; 13:77-9.
- Coen DM, Kramer MF, Dorit RL, Ohara O, Hwang CB-C, Beverley SM, Mueller PR, Wold B, Garrity PA, Finney M, Nisson PE, Rashtchian A, Liang P, Pardee AB. The Polymerase Chain Reaction. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1997: 15.0.1-15.8.8.
- Coenen MJ, Van den Heuvel LP, Nijtmans LG, Morava E, Marquardt I, Girschick HJ, et al. *SURFEIT-1* gene analysis and two-dimensional blue native gel electrophoresis in cytochrome c oxidase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265:339-44.
- Copeland WC. Inherited Mitochondrial Diseases of DNA Replication. *Annu Rev Med* 2008; 59: 131-146.
- Correia C, Coutinho AM, Diogo L, Grazina M, Marques C, Miguel T, et al. Brief report: High frequency of biochemical markers for mitochondrial dysfunction in autism: no association with the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene. *J Autism Dev Disord* 2006; 36(8): 1137-40.
- Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6927-33.
- Cormier V, Rötig A, Quartino AR, Forni GL, Cerone R, Maier M, et al. Widespread multi-tissue deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *J Pediatr* 1990;117:599-602
- Cormier-Daire V, Bonnefont JP, Rustin P, Maurage C, Ogler H, Schmitz J, et al. Mitochondrial DNA rearrangements with onset as chronic diarrhea with villous atrophy. *J Pediatr* 1994; 124:63-70.

- Cormier-Daire V, Rustin P, Rötig A, Chrétien D, Le Merrer M, Belli D, et al. Craniofacial anomalies and malformations in respiratory chain deficiency. *Am J Med Genet* 1996; 66:457-63.
- Costa E, Duque F, Oliveira J, Garcia P, Gonçalves I, Diogo L, et al. Identification of a novel AluSx-mediated deletion of exon 3 in the SBDS gene in a patient with Shwachman-Diamond syndrome. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 39:96-101.
- Cossarizza A. Tests for mitochondrial function and DNA: potentials and pitfalls. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:5-10.
- Coulter DL. Carnitine deficiency: a possible mechanism for valproate hepatotoxicity. *Lancet* 1984; 1:689.
- Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr* 2008; 27:328-39.
- Crimi M, Del Bo R, Galbiati S, Sciacco M, Bordoni A, Bresolin N, et al. Mitochondrial A12308G polymorphism affects clinical features in patients with single mtDNA macrodeletion. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:896-8.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341:233-249.
- Czok R, Lamprecht W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: Bergmeyer HU ed: *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974: 1446-51.
- Dalakas MC, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, Griffin JL. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N Engl J Med* 1990; 19:1098-105.
- Damian MS, Seibel P, Schachenmayr W, Reichmann H, Dorndorf W. VACTERL with the mitochondrial np 3243 point mutation. *Am J Med Genet* 1996; 62:398-403.
- Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 2001; 49:377-83.
- Das AM. Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol Genet Metab* 2003; 79:71-82.
- Davidzon G, Mancuso M, Ferraris S, Quinzii C, Hirano M, Peters HL, et al. POLG mutations and Alpers syndrome. *Ann Neurol* 2005; 57:921-3.
- Dawson TP, Neal JW, Llewellyn L, Thomas C. *Neuropathologic Techniques*. London: Arnold, 2003.
- De Lonlay-Debeney P, Edery P, Cormier-Daire V, Parfait B, Chrétien D, Rötig A, et al. Respiratory chain deficiency presenting as recurrent myoglobinuria in childhood. *Neuropediatrics* 1999; 30:42-4.
- De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, De Clercq I, Eyskens F, Gerlo E, et al. Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet* 2004; 41:120-4.
- De Vivo DC. The expanding clinical spectrum of mitochondrial diseases. *Brain Dev* 1993; 15:1-22.
- De Vries D, de Wijs I, Ruitenbeek W, Begeer J, Smit P, Bentlage H, van Oost B. Extreme variability of clinical symptoms among sibs in a MELAS family correlated with heteroplasmy for the mitochondrial A3243G mutation. *J Neurol Sci* 1994; 124:77-82.
- De Wit LE, Spruijt L, Schoonderwoerd GC, de Coo IF, Smeets HJ, Scholte HR, et al. A simplified and reliable assay for complex I in human blood lymphocytes. *J Immunol Methods* 2007; 326:76-82.
- Debray FG, Mitchell GA, Allard P, Robinson BH, Hanley JA, Lambert M. Diagnostic accuracy of blood lactate-to-pyruvate molar ratio in the differential diagnosis of congenital lactic acidosis. *Clin Chem* 2007a; 53:916-21.
- Debray FG, Lambert M, Chevalier I, Robitaille Y, Decarie JC, Shoubbridge EA, et al. Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases. *Pediatrics* 2007b; 119: 722-33.

- Debray FG, Lambert M, Lortie A, Vanasse M, Mitchell GA. Long-term outcome of Leigh syndrome caused by the NARP-T8993C mtDNA mutation. *Am J Med Genet A* 2007c; 143:2046-51
- Delarue A, Paut O, Guys JM, Montfort MF, Lethel V, Roquelaure B, et al. Inappropriate liver transplantation in a child with Alpers-Huttenlocher syndrome misdiagnosed as valproate-induced acute liver failure. *Pediatr Transplant* 2000; 4:67-71.
- Dillon EL, Knabe DA, Wu G. Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. *Am J Physiol* 1999; 276:1079-86.
- DiMauro S, Schotland DL, Bonilla E, Lee CP, Gambetti P, Rowland LP. Progressive ophthalmoplegia, glycogen storage, and abnormal mitochondria. *Arch Neurol* 1973; 29: 170-9.
- DiMauro S, Bonilla E, Lee CP, Schotland DL, Scarpa A, Conn H, et al. Luft's disease: further biochemical and ultrastructural studies of skeletal muscle in the second case. *J Neurol Sci* 1976; 27: 217-232.
- DiMauro S, Nicholson JF, Hays AP, Eastwood AB, Papadimitriou A, Koenigsberger R, et al. Benign infantile mitochondrial myopathy due to reversible cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol*. 1983;14:226-34.
- DiMauro S, Nicholson JF, Hays AP, Eastwood AB, Papadimitriou A, Koenigsberger R, et al. Benign infantile mitochondrial myopathy due to reversible cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol* 1983;14:226-34.
- DiMauro S, Bonilla E, Zeviani M, Servidei S, DeVivo DC, Schon EA. Mitochondrial myopathies. *J Inher Metab Dis* 1987; 10 Suppl:113-28.
- DiMauro S, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies. *Arch Neurol* 1993; 50:1197-208.
- DiMauro S, Gurgel-Giannetti J. The expanding phenotype of mitochondrial myopathy. *Curr Opin Neurol* 2005; 18:538-42.
- DiMauro S, Schon EA. The mitochondrial respiratory chain and its disorders. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 7-26.
- DiMauro S, Hirano M, Kaufmann P, Mann J. Mitochondrial psychiatry. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006a: 261-77.
- DiMauro S, Hirano M, Schon EA. Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* 2006b; 34:265-83.
- DiMauro S, Rustin P. A critical approach to the therapy of mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation diseases. *Biochim Biophys Acta* 2009 (in press)
- Diogo L, Grazina MMM, Garcia P, Fernandes A, Oliveira LM, Almeida I et al. Extra Neuromuscular Presentation of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders - Analysis of Six Portuguese Patients [abstract]. *J Inher Metab Dis* 1998; 21(2 Suppl): 84S.
- Diogo L, Drago H, Fernandes A, Carvalho G, Canha J, Mota HC, et al. Avaliação do estado redox plasmático na criança. *Acta Ped Port* 1999; 2:129-33.
- Diogo L, Garcia P, Grazina M, Cabral A, Robalo C, Oliveira CR. Brain Calcifications and mitochondrial disease—clinical report [abstract]. *J Inher Metab Dis* 2005; 28(1 Suppl): 130S.
- Diogo L, Grazina M, Garcia P, Rebelo O, Veiga MA, Cuevas J et al. Pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in the Centro region of Portugal. *Pediatr Neurol* 2009; 40:351-6.
- Diomedi-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, Caridi G, Piemonte F, Montini G et al. COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2773-80.

- Dong H, Haining RL, Thummel KE, Rettie AE, Nelson SD. Involvement of human cytochrome P450 2D6 in the bioactivation of acetaminophen. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1397-1400.
- Dougados M, Zitoun J, Laplane D, Castaigne P. Folate metabolism disorder in Kearns-Sayre syndrome. *Ann Neurol* 1983; 13:687.
- Driessen J, Willems S, Dercksen S, Giele J, Van der Staak F, Smeitink J. Anesthesia-related morbidity and mortality after surgery for muscle biopsy in children with mitochondrial defects. *Paediatr Anaesth* 2007; 17:16-21.
- D'Souza GGM, Weissig V. Approaches to mitochondrial gene therapy. *Current Gene Therapy* 2004; 4: 317-328.
- Duarte M, Videira A. Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 2009; 72:246-58
- Duez P, Kumps A, Mardens Y. GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method. *Clinical Chemistry* 1996; 42:1609-15.
- Duke T. Dysoxia and lactate. *Arch Dis Child* 1999; 81:343-50.
- Duewelhenke N, Krut O, Eysel P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:54-63.
- Edery P, Gérard B, Chretien D, Rötig A, Cerrone R, Rabier D, et al. Liver cytochrome c oxidase deficiency in a case of neonatal-onset hepatic failure. *Eur J Pediatr* 1994; 153:190-4.
- Ehlen T, Dubeau L. Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160, 441-7.
- Eleff S, Kennaway NG, Buist NR, Darley-Usmar VM, Capaldi RA, Bank WJ, et al. 31P NMR study of improvement in oxidative phosphorylation by vitamins K3 and C in a patient with a defect in electron transport at complex III in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:3529-33.
- Elpeleg O, Miller C, HersHKovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, et al. Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet* 2005; 76:1081-6.
- Engel WK, Cunningham GG. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 1963; 13: 919-23.
- Enns GM. The contribution of mitochondria to common disorders. *Mol Genet Metab* 2003; 80:11-26.
- Enns GM, Hoppel CL, DeArmond SJ, Schelley S, Bass N, Weisiger K, et al. Relationship of primary mitochondrial respiratory chain dysfunction to fiber type abnormalities in skeletal muscle. *Clin Genet* 2005; 68:337-48.
- Erlanson-Albertsson C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand* 2003; 178:405-12.
- Estevinho A, Oliveira S, Pratas J, Simões M, Mendes C, Santos MJ, et al. Mitochondrial cardiomyopathies: biochemical and genetic heterogeneity [abstract]. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(1 Suppl): 52S.
- Estivill X, Govea N, Barceló E, Badenas C, Romero E, et al. Familial progressive sensorineural deafness is mainly due to the mtDNA A1555G mutation and is enhanced by treatment of aminoglycosides. *Am J Hum Genet* 1998; 62:27-35.
- Eyer F, Felgenhauer N, Gempel K, Steimer W, Gerbitz KD, Zilker T. Acute valproate poisoning: pharmacokinetics, alteration in fatty acid metabolism, and changes during therapy. *J Clin Psychopharmacol* 2005; 25:376-80.

- Ezquerria M, Campdelacreu J, Muñoz E, Tolosa E, Martí MJ. A novel intronic mutation in the DDP1 gene in a family with X-linked dystonia-deafness syndrome. *Arch Neurol* 2005; 62:306-8.
- Faulks SC, Turner N, Else PL, Hulbert AJ. Calorie restriction in mice: effects on body composition, daily activity, metabolic rate, mitochondrial reactive oxygen species production, and membrane fatty acid composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61:781-94.
- Fenton TR. A new growth chart for preterm babies: Babson and Benda's chart updated with recent data and a new format. *BMC Pediatr* 2003; 16: 3-13.
- Ferlin T, Landrieu P, Rambaud C, Fernandez H, Dumoulin R, Rustin P, et al. Segregation of the G8993 mutant mitochondrial DNA through generations and embryonic tissues in a family at risk of Leigh syndrome. *J Pediatr* 1997; 131:447-9.
- Fernández-Vizarrá E, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:200-11.
- Filiano JJ, Goldenthal MJ, Mamourian AC, Hall CC, Marín-García J. Mitochondrial DNA depletion in Leigh syndrome. *Pediatr Neurol* 2002; 26:239-42.
- Finsterer J, Jarius C, Eichberger H. Phenotype variability in 130 adult patients with respiratory chain disorders. *J Inher Metab Dis* 2001; 24:560-76.
- Finsterer J, Milvay E. Lactate stress testing in 155 patients with mitochondriopathy. *Can J Neurol Sci* 2002; 29:49-53.
- Finsterer J. Central nervous system manifestations of mitochondrial disorders. *Acta Neurol Scand* 2006; 114:217-38.
- Finsterer J. Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders. *Acta Haematol* 2007; 118:88-98.
- Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol* 2008; 39: 223-35.
- Fodale V, La Monaca E. Propofol infusion syndrome: an overview of a perplexing disease. *Drug Saf* 2008; 31:293-303.
- Fosslien E. Mitochondrial medicine--molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31:25-67.
- Freisinger P, Horvath R, Macmillan C, Peters J, Jaksch M. Reversion of hypertrophic cardiomyopathy in a patient with deficiency of the mitochondrial copper binding protein Sco2: is there a potential effect of copper? *J Inher Metab Dis* 2004; 27:67-79.
- Fromenty B, Pessayre D. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J. Hepatol* 1997; 26:43-53
- Gago MF, Rosas MJ, Guimarães J, Ferreira M, Vilarinho L, Castro L, Carpenter S. SANDO: two novel mutations in POLG1 gene. *Neuromuscul Disord* 2006; 16:507-9.
- Garcia P, Duarte C, Grazina M, Oliva M, Robalo C, Oliveira C, et al. Acute fatty liver of pregnancy and mitochondrial disease in the foetus[abstract]. *J Inher Metab Dis* 2005; 28(1 Suppl): 127S.
- Garcia-Cazorla A, De Lonlay P, Nassogne MC, Rustin P, Touati G, Saudubray JM. Long-term follow-up of neonatal mitochondrial cytopathies: a study of 57 patients. *Pediatrics* 2005; 116:1170-7.
- Garcia-Cazorla A, De Lonlay P, Rustin P, Chretien D, Touati G, Saudubray JM. Mitochondrial respiratory chain deficiencies expressing the enzymatic deficiency in the hepatic tissue: a study of 31 patients. *J Pediatr* 2006; 149: 401- 405.

- Garcia-Cazorla A, Duarte S, Serrano M, Nascimento A, Ormazabal A, Artuch R, et al. Mitochondrial diseases mimicking neurotransmitter defects. *Mitochondrion* 2008; 8: 273-8.
- García-Silva MT, Campos Y, Ribes A, Briones P, Cabello A, Santos Borbujo J, et al. Encephalopathy, petechiae, and acrocyanosis with ethylmalonic aciduria associated with muscle cytochrome c oxidase deficiency. *J Pediatr* 1994; 125: 843-4.
- Geromel V, Parfait B, Von Kleist-Retzow JC, Chretien D, Munnich A, Rotig A, et al. The consequences of a mild respiratory chain deficiency on substrate competitive oxidation in human mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:643-6.
- Geromel V, Kadhom N, Cebalos-Picot I, Ouari O, Polidori A, Rustin P, et al. Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1221-8.
- Gibson K, Halliday JL, Kirby DM, Yaplito-Lee J, Thorburn DR, Boneh A. Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders presenting in neonates: clinical manifestations and enzymatic and molecular diagnoses. *Pediatrics* 2008; 122:1003-8.
- Gibson KM, Bennett MJ, Mize CE, Jakobs C, Rotig A, Trefz FK, et al. Methylglutaconic aciduria associated with Pearson syndrome and respiratory chain defects. *J Pediatr* 1992; 121:940-23.
- Gordon N. Alpers syndrome: progressive neuronal degeneration of children with liver disease. *Dev Med Child Neurol* 2006; 48:1001-3.
- Graf WD, Marin-Garcia J, Gao HG, Pizzo S, Naviaux RK, Markusic D, et al. Autism associated with the mitochondrial DNA G8363A transfer RNA(Lys) mutation. *J Child Neurol* 2000; 15:357-61.
- Grazina M, Diogo L, Fernandes A, Oliveira L M Godinho, A Cabral et al. Mitochondrial myopathy and merosin-positive dystrophy. *J Inher Metab Dis* 1999; 22(1 Suppl): 39S.
- Grazina M, Godinho M, Simões M, Carreira IM, Diogo L, Fernandes A et al. Biochemical approach to mitochondrial cytopathies in centre Portugal: results of three years [abstract]. *J Inher Metab Dis* 2001; 24(1 Suppl): 78S.
- Grazina MM (2004). Genoma Mitocondrial e Défice Energético no Diagnóstico das Doenças da Cadeia Respiratória Mitocondrial (Tese de Doutoramento).
- Grazina M, Pratas J, Silva F, Oliveira S, Santana I, Oliveira C. Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA mutations. *Genes Brain Behav* 2006; 5:92-107.
- Grazina MM, Diogo LM, Garcia PC, Silva ED, Garcia TD, Robalo CB, et al. Atypical presentation of Leber's hereditary optic neuropathy associated to mtDNA 11778G>A point mutation-A case report. *Eur. J Paediatr Neurol* 2007; 11:115-8.
- Grazina M, Pratas J, Simões M, Mendes C, Oliveira S, Oliveira M, et al. Ocular involvement in mitochondrial disease: biochemical and genetic diversity outline in central Portugal [abstract]. *J Inher Metab Dis* 2008; 31(1 Suppl):59S.
- Griffiths R. The abilities of young children. London: University of London press, 1984.
- Griffiths R. The Abilities of Young Children: A Comprehensive System of Mental Measurement for the First Eight Years of Life. London United Kingdom: Child Development Research Centre, 1970.
- Gupta P, Kumhar GD, Kaur G, Ramachandran VG. Clinical significance of polymicrobial bacteremia in newborns. *J Paediatr Child Health* 2005; 41:365-8.
- Hagen T, Vidal-Puig A. Mitochondrial uncoupling proteins in human physiology and disease. *Minerva Med* 2002; 93:41-57.

- Hagenfeldt L. Compromised fatty acid oxidation in mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis* 1998; 21: 613-7.
- Haginoya K, Miyabayashi S, Iinuma K, Tada K. Mosaicism of mitochondria in mitochondrial myopathy: an electronmicroscopic analysis of cytochrome c oxidase. *Acta Neuropathol* 1990; 80:642-8.
- Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, et al. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet* 2005; 77:430-441.
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Mitochondrial encephalopathies: molecular genetic diagnosis from blood samples. *Lancet* 1991; 337:1311-3.
- Hanley PJ, Ray J, Brandt U, Daut J. Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria. *J Physiol* 2002; 544:687-93.
- Hanson BJ, Capaldi RA, Marusich MF, Sherwood SW. An immunocytochemical approach to detection of mitochondrial disorders. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1281-8.
- Hargreaves IP, Sheena Y, Land JM, Heales SJR. Glutathione deficiency in patients with mitochondrial diseases: Implications for pathogenesis and treatment. *J Inher Metab Dis* 2005; 28:81- 88
- Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5:557-61.
- Haugaard SB, Andersen O, Pedersen SB, Dela F, Richelsen B, Nielsen JO, et al. Depleted skeletal muscle mitochondrial DNA, hyperlactatemia, and decreased oxidative capacity in HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Med Virol* 2005; 77:29-38
- Hause AO, Aggoun Y, Bonnet D, Sidi D, Munnich A, Rotig A, et al. Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart* 2002; 87: 346-349.
- Hays AP, Oskoui M, Tanji K, Kaufmann P, Bonilla E. Mitochondrial Neurology II: myopathies and peripheral neuropathies. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 45-74.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.
- Hirano M, Ricci E, Koenigsberger MR, Defendini R, Pavlakis SG, DeVivo DC, et al. Melas: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul Disord* 1992; 2:125-35.
- Hirano M, Silvestri G, Blake DM, Lombes A, Minetti C, Bonilla E, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1994; 44:721-7.
- Hirano M, Marti R, Ferreira-Barros C, Vilà MR, Tadesse S, Nishigaki Y, et al. Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12:417-27.
- Hirano M, Kaufmann P, De Vivo D, Tanji K. Mitochondrial Neurology I: encephalopathies. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 27- 44.
- Hirose A, Okada Y, Morita E, Tanaka Y. Benign symmetric lipomatosis associated with alcoholism. *Intern Med*. 2006; 45:1001-5.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331:717-9.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990; 46:428-33.
- Horvath R, Hudson G, Ferrari G, Fütterer N, Ahola S, Lamantea E, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 2006; 129:1674-84.

- Houtkooper RH, Rodenburg RJ, Thiels C, van Lenthe H, Stet F, Poll-The BT, Stone JE, Steward CG, Wanders RJ, Smeitink J, Kulik W, Vaz FM. Cardiolipin and monolysocardiolipin analysis in fibroblasts, lymphocytes, and tissues using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a diagnostic test for Barth syndrome. *Anal Biochem.* 2009 ;387:230-7.
- Hudson G, Keers S, Yu Wai Man P, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML, et al. Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *Am J Hum Genet* 2005; 77:1086-91.
- Hui J, Kirby DM, Thorburn DR, Boneh A. Decreased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in non-mitochondrial respiratory chain diseases. *Dev Med Child Neurol* 2006; 48:132-6.
- Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, Berner R, et al. Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 107.
- Inbal A, Avissar N, Shaklai M, Kuritzky A, Schejter A, Ben-David E, et al. Myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia: a new syndrome. *Am J Med Genet* 1995; 55: 372-378.
- Instituto Nacional de estatística. Censos 2001: recenseamento geral da população: -Lisboa: INE, 2002.
- Instituto Nacional de estatística. Estimativas Provisórias de População Residente - Portugal, NUTS II, NUTS III e Municípios - 2006 Lisboa: INE, 2007.
- Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 2006; 89: 31-41.
- Jaksch M, Lochmuller H, Schmitt F, Volpel B, Obermaier- Kusser B, Horvath R. A mutation in mt tRNA^{Leu}(UUR) causing a neuropsychiatric syndrome with depression and cataract. *Neurology* 2001; 57:1930-1.
- Janssen AJ, Trijbels FJ, Sengers RC, Wintjes LT, Ruitenbeek W, Smeitink JA, et al. Measurement of the energy-generating capacity of human muscle mitochondria: diagnostic procedure and application to human pathology. *Clin Chem* 2006a; 52:860-71.
- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 2006b; 29: 499-515.
- Jeppesen TD, Quistorff B, Wibrand F, Vissing J. *J Neurol.* 31P-MRS of skeletal muscle is not a sensitive diagnostic test for mitochondrial myopathy. 2007; 254:29-37.
- Jezek P, Zackova M, Ruzicka M, Skobisova E, Jaburek M. Mitochondrial uncoupling proteins-facts and fantasies. *Physiol Res* 2004; 53 Suppl 1: 199-211.
- Jones KL. Normal Standards. In: Jones KL ed. *Smith's Recognizable Patterns of Human Malformations.* Philadelphia: WC Saunders Company, 1997: 747-70.
- Jongpiputvanich S, Sueblinvong T, Norapucsunton T. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular diseases. *J Clin Neurosci* 2005;12:426-8.
- Jordens EZ, Palmieri L, Huizing M, Van den Heuvel LP, Sengers RC, Dorner A, et al. Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome. *Ann Neurol* 2002; 52: 95-9.
- Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, et al. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1994; 330: 962-8.
- Kaluz S, Kaluzova M, Flint PF. Rapid PCR-mediated bidirectional deletions. *Trends Genet* 1996; 12:453-4.
- Kam PC, Cardone D. Propofol infusion syndrome. *Anaesthesia* 2007; 62:690-701.

- Kang D, Hamasaki N. Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. *Curr Med Chem* 2005; 12:429-41.
- Kang HC, Lee YM, Kim HD, Lee JS, Slama A. Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia* 2007; 48: 82-8.
- Kang PB, Hunter JV, Kaye EM. Lactic acid elevation in extramitochondrial childhood neurodegenerative diseases. *J Child Neurol* 2001; 16:657-60.
- Kaufmann P, Engelstad K, Wei Y, Jhung S, Sano MC, Shungu DC, , et al. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial. *Neurology* 2006; 66:324-30.
- Kenmochi N, Suzuki T, Uechi T, Magoori M, Kuniba M, Higa S, et al. The human mitochondrial ribosomal protein genes: mapping of 54 genes to the chromosomes and implications for human disorders. *Genomics* 2001; 77:65-70.
- Khurana DS, Salganicoff L, Melvin JJ, Hobdell EF, Valencia I, Hardison HH, et al. Epilepsy and respiratory chain defects in children with mitochondrial encephalopathies. *Neuropediatrics* 2008; 39:8-13.
- Kimura A, Yoshida I, Yamashita F, Kuriya N, Yamamoto M, Nagayama K. The occurrence of intramitochondrial Ca²⁺ granules in valproate-induced liver injury. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; 8:13-8.
- King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989; 246:500-3.
- Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 1999; 52:1255-64.
- Klingenspor M. Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* 2003; 88:141-8.
- Klopstock T, Naumann M, Seibel P, Shalke B, Reiners K, Reichmann H. Mitochondrial DNA mutations in multiple symmetric lipomatosis. *Mol Cell Biochem* 1997; 174:271-5.
- Knapp AC, Todesco L, Beier K, Terracciano L, Sägesser H, Reichen J , et al. Toxicity of valproic acid in mice with decreased plasma and tissue carnitine stores. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:568-75.
- Knudsen TB, Green ML. Response characteristics of the mitochondrial DNA genome in developmental health and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004; 72:313-29.
- Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Katayama K, et al. MELAS and L-arginine therapy. *Mitochondrion* 2007; 7:133-9.
- Kollberg G, Moslemi AR, Darin N, Nennesmo I, Bjarnadottir I, Uvebrant P, et al. POLG1 mutations associated with progressive encephalopathy in childhood. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; 65:758-68.
- Koopman WJ, Visch HJ, Verkaart S, van den Heuvel LW, Smeitink JA, Willems PH. Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289:881-90.
- Kornblum C, Schröder R, Müller K, Vorgerd M, Eggers J, Bogdanow M, et al. Creatine has no beneficial effect on skeletal muscle energy metabolism in patients with single mitochondrial DNA deletions: a placebo-controlled, double-blind 31P-MRS crossover study. *Eur J Neurol* 2005; 12:300-9.
- Krähenbühl S, Brandner S, Kleinle S, Liechti S, Straumann D. Mitochondrial diseases represent a risk factor for valproate-induced fulminant liver failure. *Liver* 2000; 20:346-8.
- Kubota M, Sakakihara Y, Mori M, Yamagata T, Momoi-Yoshida M. Beneficial effect of L-arginine for stroke-like episode in MELAS. *Brain Dev* 2004; 26:481-3.

- Kujoth GC, Leeuwenburgh C, Prolla TAMitochondrial DNA mutations and apoptosis in mammalian aging. *Cancer Res* 2006; 66:7386-9.
- Kulik W, van Lenthe H, Stet FS, Houtkooper RH, Kemp H, Stone JE, Steward CG, Wanders RJ, Vaz FM. Bloodspot assay using HPLC-tandem mass spectrometry for detection of Barth syndrome. *Clin Chem*. 2008; 54: 371-8.
- Kunz WS. Different metabolic properties of mitochondrial oxidative phosphorylation in different cell types - important implications for mitochondrial cytopathies. *Exp Physiol* 2003; 88:149-54.
- Kyriacou K, Mikellidou C, Hadjianastasiou A, Middleton L, Panousopoulos A, Kyriakides T. Ultrastructural diagnosis of mitochondrial encephalo myopathies revisited. *Ultrastruct Pathol* 1999; 23:163-70.
- Kyriacou K, Kyriakides T. Mitochondrial encephalomyopathies: a review of routine morphological diagnostic methods with emphasis on the role of electron microscopy *J Submicrosc Cytol Pathol* 2006; 38:201-8.
- Kwok S, Kellog DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res* 1990, 18: 999-1005.
- Lacbawan F, Tiffit CJ, Luban NL, Schmandt SM, Guerrera M, Weinstein S, et al. Clinical heterogeneity in mitochondrial DNA deletion disorders: a diagnostic challenge of Pearson syndrome. *Am J Med Genet* 2000; 95:266-8.
- Lalani SR, Vladutiu GD, Plunkett K, Lotze TE, Adesina AM, Scaglia F. Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q deficiency. *Arch Neurol* 2005; 62:317-20.
- Lam CW, Lau CH, Williams JC, Chan YW, Wong LJ. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) triggered by valproate therapy. *Eur J Pediatr* 1997; 156:562-4.
- Lamperti C, Naini A, Hirano M, De Vivo DC, Bertini E, Servidei S, et al. Neurology. Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency 2003; 60:1206-8.
- Land JM, Morgan-Hughes JA, Hargreaves I, Heales SJ. Mitochondrial disease: a historical, biochemical, and London perspective. *Neurochem Res* 2004; 29:483-91.
- Larsson NG, Rustin P. Animal models for respiratory chain disease. *Trends Mol Med* 2001; 7:578-81.
- Leão M. Valproate as a cause of hyperammonemia in heterozygotes with ornithine-transcarbamylase deficiency. *Neurology* 1995; 45:593-4.
- Lee HF, Lee HJ, Chi CS, Tsai CR, Chang TK, Wang CJ. The neurological evolution of Pearson syndrome: case report and literature review. *Eur J Paediatr Neurol* 2007; 11:208-14.
- Lee JS, Hwang JS, Ryu KH, Lee EH, Kim SH. Mitochondrial respiratory complex I deficiency simulating spinal muscular atrophy. *Pediatr Neurol* 2007; 36:45-7.
- Lee YM, Kang HC, Lee JS, Kim SH, Kim EY, Lee SK, et al. Mitochondrial respiratory chain defects: Underlying etiology in various epileptic conditions. *Epilepsia* 2008; 49:685-90.
- Lemasters JJ, Hackenbrock CR. Continuous measurement of adenosine triphosphate with firefly luciferase luminescence. *Methods Enzymol* 1979; 56:530-44.
- Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet*. 2000a; 355:299-304.
- Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects. *Lancet* 2000b; 355:389-94.
- Lestienne P, Ponsot G. Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet* 1988; 1:885.

- Lestienne P. Mitochondria, witness to our origins, and localization of respiration and energy production. In: Patrick Lestienne ed, *Mitochondrial Diseases Models and Methods*. Berlin: Springer-Verlag, 1999: 1-4.
- Lev D, Gilad E, Leshinsky-Silver E, Hourli S, Levine A, Saada A, et al. Reversible fulminant lactic acidosis and liver failure in an infant with hepatic cytochrome-c oxidase deficiency. *J Inher Metab Dis* 2002; 25:371-7.
- Levy RJ, Deutschman CS. Cytochrome c oxidase dysfunction in sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35:S468-75.
- Liang MH, Wong LJ. Yield of mtDNA mutation analysis in 2,000 patients. *Am J Med Genet* 1998; 77: 395-400.
- Liga Portuguesa Contra a Epilepsia. *Classificação das epilepsias e das crises epilépticas* 1996.
- Limongelli A, Schaefer J, Jackson S, Invernizzi F, Kirino Y, Suzuki T, et al. Variable penetrance of a familial progressive necrotising encephalopathy due to a novel tRNA(Ile) homoplasmic mutation in the mitochondrial genome. *J Med Genet* 2004; 41:342-9.
- Lodi R, Hart PE, Rajagopalan B, Taylor DJ, Crilley JG, Bradley, et al. Antioxidant treatment improves in vivo cardiac and skeletal muscle bioenergetics in patients with Friedreich's ataxia. *Ann Neurol* 2001; 49: 590-6.
- Longley MJ, Graziewicz MA, Bienstock RJ, Copeland WC. Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma. *Gene* 2005; 354:125-31.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control. A correlated clinical, biochemical and morphological study. *J Clin Invest* 1962; 41:1776-1804.
- Luft R. Introduction: the birth of mitochondrial medicine. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 27- 44.
- Luís PB, Ruiten JP, Aires CC, Soveral G, de Almeida IT, Duran M, et al. Valproic acid metabolites inhibit dihydrolipoyl dehydrogenase activity leading to impaired 2-oxoglutarate-driven oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767: 1126-33.
- Lyon G, Kolodny EH, Pastores GM, editors. *Neurology of Hereditary Metabolic Diseases of Children*. 3th ed. New York: McGraw-Hill, 2006: 142-151
- Mandel H, Szargel R, Labay V, Elpeleg O, Saada A, Shalata A, et al. The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat Genet* 2001; 29:337-41.
- Mano A, Kikukawa H, Tsuchiya T, Tanaka K, Tanaka M. A case of mitochondrial myopathy with external ophthalmoplegia and ataxic neuropathy. *Clin Neurol* 2003; 43:564-7.
- Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais. Lisboa: American Psychiatric Association; 2002.
- Maechler P, De Andrade PB. Mitochondrial damages and the regulation of insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:824-827.
- Majander A, Rapola J, Sariola H, Suomalainen A, Pohjavuori M, Pihko H. Diagnosis of fatal infantile defects of the mitochondrial respiratory chain: age dependence and postmortem analysis of enzyme activities. *J Neurol Sci* 1995; 134:95-102.
- Malgat M, Letellier T, Durrieu G, Mazat JP. Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: Patrick Lestienne ed, *Mitochondrial Diseases Models and Methods*. Berlin: Springer-Verlag; 1999: 1-4.
- Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 2002; 39:162-9.

- Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet* 2003;72:333-9.
- Mancuso M, Filosto M, Bonilla E, Hirano M, Shanske S, Vu TH, et al. Mitochondrial myopathy of childhood associated with mitochondrial DNA depletion and a homozygous mutation (T77M) in the TK2 gene. *Arch Neurol* 2003;60:1007-9.
- Mancuso M, Ferraris S, Pancrudo J, Feigenbaum A, Raiman J, Christodoulou J, et al. New DGK gene mutations in the hepatocerebral form of mitochondrial DNA depletion syndrome. *Arch Neurol* 2005; 62:745-7.
- Marik PE. Propofol: therapeutic indications and side-effects. *Curr Pharm Des* 2004; 10:3639-49.
- Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ. Mitochondrial dysfunction after fetal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:1029-32.
- Marín-García J, Goldenthal MJ, Sarnat HB. Probing striated muscle mitochondrial phenotype in neuromuscular disorders. *Pediatr Neurol* 2003; 29:26-33.
- Marriage BJ, Clandinin MT, MacDonald IM, Glerum DM. The use of lymphocytes to screen for oxidative phosphorylation disorders. *Anal Biochem* 2003; 313:137-44.
- Marriage BJ, Clandinin MT, Macdonald IM, Glerum DM. Cofactor treatment improves ATP synthetic capacity in patients with oxidative phosphorylation disorders. *Mol Genet Metab* 2004; 81:263-72.
- Martin B, Sundara L. Escala de Avaliação das Competências no Desenvolvimento Infantil. Shedule of Growing Skills II. Lisboa: CEGOC-TEA; 2003.
- Martinez Bermejo A, Pascual Castroviejo I, Merinero B, Campos Y, Lopez Martin V, Arcas J, et al. Complex I and IV deficits in the mitochondrial respiratory chain in two siblings with type I glutaric aciduria. *Neurologia* 1994; 9:303-6.
- Martínez-Odriozola P, Muñoz-Sánchez J, Gutiérrez-Macías A, Arriola-Martínez P, Montero-Aparicio E, Ezpeleta-Baquedano C, et al. An analysis of 182 enterococcal bloodstream infections: epidemiology, microbiology, and outcome. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25:503-7.
- Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *Neuroophthalmol* 2000; 20:166-70.
- Mason PA, Lightowlers RN. Why do mammalian mitochondria possess a mismatch repair activity? *FEBS Lett.* 2003; 554:6-9.
- Maurer I, Moller HJ. Inhibition of complex I by neuroleptics in normal human brain cortex parallels the extrapyramidal toxicity of neuroleptics. *Mol. Cell. Biochem* 1997; 174: 255-259.
- Matthews PM, Tampieri D, Berkovic SF, Andermann F, Silver K, Chityat D, et al. Magnetic resonance imaging shows specific abnormalities in the MELAS syndrome. *Neurology* 1991; 41:1043-6.
- Matthews PM, Ford B, Dandurand RJ, Eidelman DH, O'Connor D, Sherwin A, et al. Coenzyme Q10 with multiple vitamins is generally ineffective in treatment of mitochondrial disease. *Neurology* 1993; 43:884-90.
- McCormick AL, Smith VL, Chow D, Mocarski ES. Disruption of Mitochondrial Networks by the Human Cytomegalovirus UL37 Gene Product Viral Mitochondrion-Localized Inhibitor of Apoptosis. *Journal of Virology* 2003; 77: 631-641.
- McFarland R, Clark KM, Morris AA, Taylor RW, Macphail S, Lightowlers RN, et al. Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nat Genet* 2002; 30:145-6.
- McKenzie M, Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT. Analysis of mitochondrial subunit assembly into respiratory chain complexes using Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 2007; 364:128-37..

- McShane MA, Hammans SR, Sweeney M, Holt IJ, Beattie TJ, Brett EM, et al. Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *Am J Hum Genet* 1991;48:39-42.
- Melegh B, Trombitás K. Valproate treatment induces lipid globule accumulation with ultrastructural abnormalities of mitochondria in skeletal muscle. *Neuropediatrics* 1997; 28:257-61.
- Merlo-Pich M, Deleonardi G, Biondi A, Lenaz G. Methods to detect mitochondrial function. *Experimental Gerontology* 2004; 39: 277-281.
- Mierau GW, Tyson RW, Freehauf CL. Role of electron microscopy in the diagnosis of mitochondrial cytopathies. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7:637-40.
- Miles L, Wong BL, Dinopoulos A, Morehart PJ, Hofmann IA, Bove KE. Investigation of children for mitochondriopathy confirms need for strict patient selection, improved morphological criteria, and better laboratory methods. *Hum Pathol* 2006; 37: 173-84.
- Miller C, Saada A, Shaul N, Shabtai N, Ben-Shalom E, Shaag A, et al. Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol* 2004; 56:734-8.
- Mirabella M, Di Giovanni S, Silvestri G, Tonali P, Servidei S. Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain* 2000; 123:93-104.
- Miró O, Barrientos A, Alonso JR, Casademont J, Jarreta D, Urbano-Márquez A, et al. Effects of general anaesthetic procedures on mitochondrial function of human skeletal muscle. *Eur J Clin Pharmacol* 1999a; 55:35-41.
- Miró O, Alonso JR, Jarreta D, Casademont J, Urbano-Márquez A, Cardellach F. Smoking disturbs mitochondrial respiratory chain function and enhances lipid peroxidation on human circulating lymphocytes. *Carcinogenesis* 1999b; 20:1331-6.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961;191:144-8.
- Mitchell G, Ogier H, Munnich A, Saudubray JM, Shirrer J, Charpentier C, et al. Neurological deterioration and lactic acidemia in biotinidase deficiency. A treatable condition mimicking Leigh's disease. *Neuropediatrics* 1986; 17:129-31.
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2008.
- Miyabayashi S, Ito T, Narisawa K, Iinuma K, Tada K. Biochemical study in 28 children with lactic acidosis, in relation to Leigh's encephalomyelopathy. *Eur J Pediatr* 1985; 143:278-83.
- Modica-Napolitano JS, Lagace CJ, Brennan WA, Aprille JR. Differential effects of typical and atypical neuroleptics on mitochondrial function *in vitro*. *Arch Pharm Res* 2003; 26:951-9.
- Moore D, Strauss WM, Richards E, Reichardt M, Rogers S, Wilson K, Finney M, Chory J, Ribaldo RK, Baldwin Jr AS, Brown T, Ellington A, Green R, Richards EJ, Budelier K, Schorr J. Preparation and Analysis of DNA. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editors. John Wiley & Sons, 1997: 2.0.1- 2.14.8.
- Montero R, Artuch R, Briones P, Nascimento A, Garcia-Cazorla A, Vilaseca MA, et al. Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *Biofactors* 2005; 25:109-15.
- Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989; 320:1293-9.
- Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, et al. mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 1991; 48:492-501.

- Morava E, Sengers R, Ter Laak H, Van Den Heuvel L, Janssen A, Trijbels F, et al. Congenital hypertrophic cardiomyopathy, cataract, mitochondrial myopathy and defective oxidative phosphorylation in two siblings with Sengers-like syndrome. *Eur J Pediatr* 2004; 163:467-71.
- Morava E, Hogeveen M, De Vries M, Ruitenbeek W, de Boode WP, Smeitink J. Normal serum alanine concentration differentiates transient neonatal lactic acidemia from an inborn error of energy metabolism. *Biol Neonate* 2006a; 90:207-9.
- Morava E, Van den Heuvel L, Hol F, De Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ, et al. Mitochondrial disease criteria: diagnostic applications in children. *Neurology* 2006b; 67:1823-6.
- Morris AA, Taylor RW, Birch-Machin MA, Jackson MJ, Coulthard MG, Bindoff LA, et al. Neonatal Fanconi syndrome due to deficiency of complex III of the respiratory chain. *Pediatr Nephrol* 1995; 9:407-11.
- Morris AA, Leonard JV, Brown GK, Bidouki SK, Bindoff LA, Woodward CE, et al. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. *Ann Neurol* 1996; 40:25-30.
- Morris AA. Mitochondrial respiratory chain disorders and the liver. *Liver* 1999; 19:357-68.
- Mullane NR, Iversen C, Healy B, Walsh C, Whyte P, Wall PG, et al. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health. *Minerva Pediatr* 2007; 59:137-48.
- Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, et al. Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics* 2004; 84:1041-50.
- Munnich A, Rötig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP, et al. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inher Metab Dis* 1996; 19:521-7.
- Munnich A, Rötig A, Cormier-Daire V, Rustin P. Clinical Presentation of Respiratory Chain Deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease*. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 2261-2274.
- Munnich A, Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet* 2001; 106:4-17.
- Munnich A. Defects of the respiratory chain. In: Fernandes J, Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases- Diagnosis and Treatment*. 4th ed. Heidelberg: Medizin Verlag Springer, 2006:199-209.
- Muñoz-Málaga A, Bautista J, Salazar JA, Aguilera I, Garcia R, Chinchon I, et al. Lipomatosis, proximal myopathy, and the mitochondrial 8344 mutation. A lipid storage myopathy? *Muscle Nerve* 2000; 23:538-42.
- Naini A, Kaufmann P, Shanske S, Engelstad K, De Vivo DC, Schon EA. Hypocitrullinemia in patients with MELAS: an insight into the "MELAS paradox". *J Neurol Sci* 2005; 229-230:187-93.
- Naviaux RK. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease. *Mitochondrion* 2004; 4:351-61.
- Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 2004; 55:706-712.
- Neilson DE, Eiben RM, Waniewski S, Hoppel CL, Varnes ME, Bangert BA, et al. Autosomal dominant acute necrotizing encephalopathy. *Neurology* 2003; 61:226-30.
- Nelson DL, Cox MM. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000: 659-721.
- Neupert W. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 863-917.

- Neustadt J, Pieczenik SR. Medication-induced mitochondrial damage and disease. *Mol Nutr Food Res*. 2008; 52:780-8.
- Neves N, Garcia P, Proença T, Baldeiras I, Grazina M, Vilarinho L, et al. Oxidative stress in childhood mitochondrial respiratory disease- 20 cases [abstract]. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(1Suppl):57S.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2503-2516.
- Niers L, van den Heuvel L, Trijbels F, Sengers R, Smeitink J. Prerequisites and strategies for prenatal diagnosis of respiratory chain deficiency in chorionic villi. *J Inherit Metab Dis* 2003;26(7):647-58.
- Niaudet P. Mitochondrial disorders and the kidney. *Arch Dis Child* 1998; 78: 387-90.
- Nikoskelainen EK, Savontaus ML, Huoponen K, Antila K, Hartiala J. Pre-excitation syndrome in Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet* 1994; 344:857-8
- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999; 283:689-92.
- Nissenkorn A, Zeharia A, Lev D, Fatal-Valevski A, Barash V, Gutman A, et al. T Multiple presentation of mitochondrial disorders. *Arch Dis Child* 1999; 81:209-14.
- Noll F. L(+)-Lactate. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Verlag Chemie, RFA, 1984:582-8.
- Nyhan WL, Barshop BA, Ozand PT. *Atlas of Metabolic Disease*. 2nd ed. London: Hodder Education, 2005.
- Old SL, Johnson MA. Methods of microphotometric assay of succinate dehydrogenase and cytochrome c oxidase activities for use on human skeletal muscle. *Histochem J* 1989; 21:545-55.
- Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:2379-82.
- Oglesbee D, Freedenberg D, Kramer KA, Anderson BD, Hahn SH. Normal muscle respiratory chain enzymes can complicate mitochondrial disease diagnosis. *Pediatr Neurol* 2006; 35:289-92.
- Oguro H, Iijima K, Takahashi K, Nagai A, Bokura H, Yamaguchi S, et al. Successful treatment with succinate in a patient with MELAS. *Intern Med* 2004; 43:427- 431
- Oliveira G, Diogo L, Grazina M, Garcia P, Ataíde A, Marques C, et al. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a population-based study. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47:185-9.
- Ohlson KB, Shabalina IG, Lennström K, Backlund EC, Mohell N, Bronnikov GE, et al. Inhibitory effects of halothane on the thermogenic pathway in brown adipocytes: localization to adenylyl cyclase and mitochondrial fatty acid oxidation. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:463-77.
- Olsen RK, Olpin SE, Andresen BS, Miedzybrodzka ZH, Pourfarzam M, Merinero B, et al. ETFDH mutations as a major cause of riboflavin-responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency. *Brain* 2007; 130: 2045-54.
- Opdal SH, Rognum TO, Torgersen H, Vege A. Mitochondrial DNA point mutations detected in four cases of sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*. 1999; 88:957-60.
- Organização Mundial de Saúde. CID 10 - Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde. 10ª ed. Centro Colaborador da OMS para Classificação de Doenças São Paulo: EDUSP, 1994.
- Osório R. Resultados e Conclusões. In: Programa Nacional de Diagnóstico Precoce - Relatórios de Atividades 1989-1996. Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães ed. Porto. 1989: 38; 1990: 39; 1991:45; 1992: 23; 1993: 61; 1994:53; 1995: 49; 1996: 50.

- Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, Erazo R, Gurgel-Giannetti J, Krishna S, et al. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol* 2006; 63:1122-6.
- Otabe S, Sakura H, Shimokawa K, Mori Y, Kadowaki H, Yasuda K, et al. The high prevalence of the diabetic patients with a mutation in the mitochondrial gene in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:768-71.
- Owen R IV, Lewin AP, Peel A, Wang J, Guy J, Hauswirth WW, et al. Recombinant adeno-associated virus vector-based gene transfer for defects in oxidative metabolism. *Hum Gene Ther* 2000; 11:2067-78.
- Owen R IV, Flotte TR. Approaches and limitations to gene therapy for mitochondrial diseases. *Antioxid Redox Signal* 20013:451-60.
- Pagnamenta AT, Hargreaves IP, Duncan AJ, Taanman JW, Heales SJ, Land JM, et al. Phenotypic variability of mitochondrial disease caused by a nuclear mutation in complex II. *Mol Genet Metab* 2006; 89:214-21.
- Panetta J, Smith LJ, Boneh A. Effect of high-dose vitamins, coenzyme Q and high-fat diet in paediatric patients with mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:487-98.
- Panetta J, Gibson K, Kirby DM, Thorburn DR, Boneh A. The importance of liver biopsy in the investigation of possible mitochondrial respiratory chain disease. *Neuropediatrics* 2005; 36:256-9.
- Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, et al. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 1999; 23:333-7.
- Parfait B, De Lonlay P, Von Kleist-Retzow JC, Cormier-Daire V, Chrétien D, Rötig A, et al. The neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa (NARP) syndrome mtDNA mutation (T8993G) triggers muscle ATPase deficiency and hypocitrullinaemia. *Eur J Pediatr* 1999; 158:55-8.
- Patterson K. Mitochondrial muscle pathology. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7:629-32.
- Patton JR, Bykhovskaya Y, Mengesha E, Bertolotto C, Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA): missense mutation in the pseudouridine synthase 1 (PUS1) gene is associated with the loss of tRNA pseudouridylation. *J Biol Chem* 2005; 280:19823-8.
- Paul R, Santucci S, Saunieres A, Desnuelle C, Paquis-Flucklinger V. Rapid mapping of mitochondrial DNA deletions by large-fragment PCR. *Trends Genet* 1996; 12: 131-132.
- Pavlakakis 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;16:481-8.
- Pearson HA, Lobel JS, Kocoshis SA, Naiman JL, Windmiller J, Lammi AT, et al. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr* 1979; 95:976-84.
- Péquignot MO, Dey R, Zeviani M, Tiranti V, Godinot C, Poyau A, et al. Mutations in the SURF1 gene associated with Leigh syndrome and cytochrome C oxidase deficiency. *Hum Mutat* 2001; 17:374-81.
- Pereira C, Nogueira C, Barbot C, Tessa A, Soares C, Fattori F, et al. Identification of a new mtDNA mutation (14724G>A) associated with mitochondrial leukoencephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354:937-41.
- Pérez-Martínez X, Funes S, Camacho-Villasana Y, Marjavaara S, Tavares-Carreón F, Shingú-Vázquez M. Protein synthesis and assembly in mitochondrial disorders. *Curr Top Med Chem* 2008; 8:1335-50.
- Pesce V, Cormio A, Fracasso F, Vecchiet J, Felzani G, Lezza AM, et al. Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:1223-33.

- Pereira L, Cunha C, Alves C, Amorim A. African female heritage in Iberia: a reassessment of mtDNA lineage distribution in present times. *Hum Biol* 2005; 77:213-29.
- Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12736-7.
- Phoenix C, Schaefer AM, Elson JL, Morava E, Bugiani M, Uziel G, et al. A scale to monitor progression and treatment of mitochondrial disease in children. *Neuromuscul Disord* 2006; 16:814-20.
- Pineda M, Ormazabal A, López-Gallardo E, Nascimento A, Solano A, Herrero MD, et al. Cerebral folate deficiency and leukoencephalopathy caused by a mitochondrial DNA deletion. *Ann Neurol*. 2006; 59:394-8.
- Poggi-Travert F, Martin D, Billette de Villemeur T, Bonnefont JP, Vassault A, Rabier D, et al. Metabolic intermediates in lactic acidosis: compounds, samples and interpretation. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19:478-88.
- Ponchaut S, Van Hoof F, Veitch K. Cytochrome aa3 depletion is the cause of the deficient mitochondrial respiration induced by chronic valproate administration. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 644-7.
- Programa Nacional de Diagnóstico Precoce (<http://www.diagnosticoprecoce.org/>)
- Qi X, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J. Optic neuropathy induced by reductions in mitochondrial superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1088-96.
- Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, DiMauro S. Mutation in Para-Hydroxybenzoate-Polyprenyl Transferase (COQ2) Causes Primary Coenzyme Q10 Deficiency. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 345-9.
- Quinzii CM, López LC, Naini A, DiMauro S, Hirano M. Human CoQ10 deficiencies. *Biofactors* 2008; 32: 113-8.
- Racine AC, Blanchot G, Le Vaillant C, Boog G. Pregnancy in a patient with mitochondrial disease. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004; 33:131-9.
- Rakheja D, Bennett MJ, Foster BM, Domiati-Saad R, Rogers BB. Evidence for fatty acid oxidation in human placenta, and the relationship of fatty acid oxidation enzyme activities with gestational age. *Placenta* 2002; 23:447-50.
- Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet*. 2001; 106:62-70.
- Ramaekers VT, Weis J, Sequeira JM, Quadros EV, Blau N. Mitochondrial complex I encephalomyopathy and cerebral 5-methyltetrahydrofolate deficiency. *Neuropediatrics* 2007; 38:184-7.
- Rawles JM, Weller RO. Familial association of metabolic myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia. *Am J Med* 1974; 56: 891-7.
- Reichenbach J, Schubert R, Horvath R, Petersen J, Fütterer N, Malle E, et al. Fatal neonatal-onset mitochondrial respiratory chain disease with T cell immunodeficiency. *Pediatr Res* 2006; 60:321-6.
- Rifai Z, Welle S, Kamp C, Thornton CA. Ragged red fibers in normal aging and inflammatory myopathy. *Ann Neurol* 1995; 37:24-9.
- Riggs JE, Schochet SS Jr, Fakadej AV, Papadimitriou A, DiMauro S, Crosby TW, et al. Mitochondrial encephalomyopathy with decreased succinate-cytochrome c reductase activity. *Neurology* 1984; 34:48-53.
- Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC. Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol* 1992; 48:122-6.
- Robinson BH. Human cytochrome oxidase deficiency. *Pediatr Res* 2000; 48:581-5.
- Rocha JA, Braga TF, Maia CAM Jr, Silva JC, Toyama C, Gama HPP, et al. Lactate detection by MRS in mitochondrial encephalopathy: optimization of technical parameters. *J Neuroimaging* 2008; 18:1-8.

- Rodriguez MC, MacDonald JR, Mahoney DJ, Parise G, Beal MF, Tarnopolsky MA. Beneficial effects of creatine, CoQ10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve* 2007; 35: 235-42.
- Romero NB, Coquet M, Carrier H. Histopathology of skeletal muscle mitochondria. In: Lestienne P, editor. *Mitochondrial diseases- models and methods*. Berlin: SpringerVerlag, 1999:343-355.
- Rose LV, Rose NT, Elder JE, Thorburn DR, Boneh A. Ophthalmologic presentation of oxidative phosphorylation diseases of childhood. *Pediatr Neurol* 2008;38:395-7.
- Rotig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chretien D, Kadhom N, Ederly P, et al. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* 2000; 356:391-5.
- Rotig A, Lebon S, Zinovieva E, Mollet J, Sarzi E, Bonnefont JP, et al. Molecular diagnostics of mitochondrial disorders. *Biochim Biophys Acta* 2004;1659:129-35.
- Rotig A, Niaudet P. Mitochondrial nephrology. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006:197-207.
- Rowland LP, Blake DM, Hirano M, Di Mauro S, Schon EA, Hays AP, et al. Clinical syndromes associated with ragged red fibers. *Rev Neurol* 1991; 147(6-7):467-73.
- Rowland LP. Mitochondrial encephalomyopathies: lumping splitting and melting. In: Schapira AHV e DiMauro S, editors. *Mitochondrial Disorders in Neurology*. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd, 1994: 116-29.
- Rubio-Gozalbo ME, Smeitink JA, Ruitenbeek W, Ter Laak H, Mullaart RA, Schuelke M, et al. Spinal muscular atrophy-like picture, cardiomyopathy, and cytochrome oxidase deficiency. *Neurology* 1999; 52:383-6.
- Rubio-Gozalbo ME, Dijkman KP, Van den Heuvel LP, Sengers RC, Wendel U, Smeitink JA. Clinical differences in patients with mitochondriocytopathies due to nuclear versus mitochondrial DNA mutations. *Hum Mutat* 2000a; 15:522-32.
- Rubio-Gozalbo ME, Sengers RC, Trijbels JM, Doesburg WH, Janssen AJ, Verbeek AL. A prognostic index as diagnostic strategy in children suspected of mitochondriocytopathy. *Neuropediatrics* 2000b; 31:114-21.
- Ruitenbeek W, Wendel U, Trijbels F, Sengers R. Mitochondrial energy metabolism. In: *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. Blau N, Duran M, Blaskovics ME, editors. London: Chapman & Hall, 1996: 391-406.
- Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* 2007; 35:823-8.
- Rumbach L, Warter JM, Rendon A, Marescaux C, Micheletti G, Waksman A. Inhibition of oxidative phosphorylation in hepatic and cerebral mitochondria of sodium valproate-treated. *J Neurol Sci* 1983; 61:417-23.
- Rustin P, Lebedois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaut JF, Rotig A, et al. The investigation of respiratory chain disorders in heart using endomyocardial biopsies. *J Inher Metab Dis* 1993; 16:541-4.
- Rustin P, Chrétien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and Molecular investigations in Respiratory Chain Deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228: 35-51.
- Rustin P, Rötig A. Inborn errors of complex II--unusual human mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1553:117-22.
- Rutledge JC, Finn LS. Pediatric mitochondrial disease: do we have the energy to make the diagnosis? *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7:641-5.
- Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet* 2001; 29: 342-4.

- Saada A, Shaag A, Arnon S, Dolfin T, Miller C, Fuchs-Telem D, et al. Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation. *J Med Genet* 2007; 44:784-6.
- Salviati L, Sacconi S, Murer L, Zacchello G, Franceschini L, Laverda AM, et al. Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 2005; 65:606-8.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mammalian Cells. In: *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Irwin N, Ford N, Ferguson M, Ockler M, editors. 2nd edition. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987: 9.14 – 9.22.
- Santra S, Gilkerson RW, Davidson M, Schon EA. Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann Neurol* 2004; 56:662-9.
- Sanz A, Gomez J, Caro P, Barja G. Carbohydrate restriction does not change mitochondrial free radical generation and oxidative DNA damage. *J Bioenerg Biomembr* 2006; 38: 327-33.
- Saraiva JM, Matoso E, Garcia P, Bento G, Diogo L, Marques I. Cromossomopatia com cariótipo normal em linfócitos: caso clínico. *Acta Pediátrica Portuguesa* 2003; 4: 303-6.
- Sarnat HB, Marin-Garcia J. Pathology of mitochondrial encephalomyopathies. *Can J Neurol Sci* 2005; 32:152-66.
- Sarzi E, Bourdon A, Chrétien D, Zarhrate M, Corcos J, Slama A, et al. Mitochondrial DNA depletion is a prevalent cause of multiple respiratory chain deficiency in childhood. *J Pediatr* 2007; 150:531-4.
- Saudubray JM, Desguerre I, Sedel F, Charpentier. A Clinical Approach to Inherited Metabolic Diseases. In: *Fernandes J, Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter JH, editors. Inborn Metabolic Diseases–Diagnosis and Treatment*. 4nd ed. Heidelberg: Medizin Verlag Springer, 2006: 3-57.
- Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, Belmont JW, Smith EO, Neish SR, et al. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 2004; 114:925-31.
- Sciaccio M, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes CT. Distribution of wild-type and common deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum Mol Genet* 1994; 3:13-9.
- Sciaccio M, Prella A, Comi GP, Napoli L, Battistel A, Bresolin N, et al. Retrospective study of a large population of patients affected with mitochondrial disorders: clinical, morphological and molecular genetic evaluation. *J Neurol* 2001; 248:778-88.
- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders-past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659:115-20.
- Schaefer AM, Phoenix C, Elson JL, McFarland R, Chinnery PF, Turnbull DM. Mitochondrial disease in adults: a scale to monitor progression and treatment. *Neurology* 2006; 66: 1932-4.
- Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 2000; 19:1777-83.
- Schapira AH. Primary and secondary defects of the mitochondrial respiratory chain *J Inherit Metab Dis* 2002; 25:207-14.
- Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet* 2006; 368:70-82.
- Scheffler IE. Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49:3-26.
- Schon EA. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:555-60.
- Schon EA, DiMauro S. Medicinal and genetic approaches to the treatment of mitochondrial disease. *Curr Med Chem* 2003; 10:2523-33.

- Schon EA. Mitochondria Genetics. Mitochondrial Disorders in Neurology American Academy of Neurology - 61st Annual Meeting, 2009
- Schulze K, Schultheiss HP. The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *Eur Heart J* 1995; 16:64-7.
- Schwab MA, Sauer SW, Okun JG, Nijtmans LG, Rodenburg RJ, Van den Heuvel LP, et al. Secondary mitochondrial dysfunction in propionic aciduria: a pathogenic role for endogenous mitochondrial toxins. *Biochem J* 2006; 398:107-12.
- Setterfield K, Williams AJ, Donald J, Thorburn DR, Kirby DM, Trounce I, et al. Flow cytometry in the study of mitochondrial respiratory chain disorders. *Mitochondrion* 2002; 1:437-45.
- Sengers A, Ter Haar A, Trijbels F, Willems L, Daniels O, Stadhouders M. Congenital cataract and mitochondrial myopathy of skeletal and heart muscle associated with lactic acidosis after exercise. *J. Pediatr* 1975; 86: 873-880.
- Seviour KB, Hatamochi A, Stewart IA, Bykhovskaya Y, Allen-Powell DR, Fischel-Ghodsian N, et al. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *American Journal of Medical Genetics* 1998; 75: 179-185
- Shah NS, Mitchell WG, Boles RG. Mitochondrial disorders: a potentially under-recognized etiology of infantile spasms. *J Child Neurol* 2002; 17:369-72.
- Shimamura A. Shwachman-Diamond syndrome. *Semin Hematol* 2006; 43:178-88.
- Shimizu S, Tani Y, Yamada H, Tabata M, Murachi T. Enzymatic determination of serum-free fatty acids: a colorimetric method. *Anal Biochem* 1980; 107:193-8.
- Shinde SB, Save VC, Patil ND, Mishra KP, Tendolkar AG. Impairment of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in tetralogy of Fallot. *Clin Chim Acta* 2007; 377:138-43.
- Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mtDNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:7952-6.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990; 61:931-7.
- Shoffner JM, Wallace DC. Oxidative Phosphorylation Diseases. In: *The metabolic basis of inherited disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995: 1535-1609.
- Schon EA. Mitochondrial Genetics. In: *Mitochondrial Disorders in Neurology*; 61st Annual Meeting of the American Academy of Neurology 2009.
- Shoubridge EA. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet* 2001a; 10: 2277-84.
- Shoubridge EA. Cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Med Genet* 2001b; 106:46-52.
- Shy GM, Gonatas NK. Human miopathy with giant abnormal mitochondria. *Science* 1964; 145:493-6.
- Silva MF, Ruiten JP, IJlst L, Allers P, ten Brink HJ, Jakobs C, et al. Synthesis and intramitochondrial levels of valproyl-coenzyme A metabolites. *Anal Biochem* 2001; 290:60-7.
- Silva S, Robalo C, Garcia P, Grazina M, Oliveira CR, Diogo L. West syndrome and mitochondrial dysfunction[abstract]. *J Inherit Metab Dis* 2008; 31(1Suppl):52S.
- Sim KG, Carpenter K, Hammond J, Christodoulou J, Wilcken B. Acylcarnitine profiles in fibroblasts from patients with respiratory chain defects can resemble those from patients with mitochondrial fatty acid beta-oxidation disorders. *Metabolism* 2002; 51:366-71.

- Simonati A, Filosto M, Savio C, Tomelleri G, Tonin P, Dalla Bernardina B, et al. Features of cell death in brain and liver, the target tissues of progressive neuronal degeneration of childhood with liver disease (Alpers-Huttenlocher disease). *Acta Neuropathol (Berl)* 2003; 106:57-65.
- Singh R, Ellard S, Hattersley A, Harries LW. Rapid and sensitive real-time polymerase chain reaction method for detection and quantification of 3243A>G mitochondrial point mutation. *J Mol Diagn* 2006; 8:225-30.
- Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* 2003; 126:1905-12.
- Smeitink J, Sengers R, Trijbels F, Van den Heuvel L. Human NADH: ubiquinone oxidoreductase. *J Bioenerg Biomembr* 2001a; 33:259-66.
- Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2001b;2:342-52.
- Smeitink J, Heuvel B, Trijbels F, Ruitenbeek W, Sengers R. Mitochondrial energy metabolism. In: Blau N, Duran M, Blaskovics ME, Gibson KM, editors. *Physician's guide to the Laboratory of Metabolic Diseases*. 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2003: 519-535.
- Smith PM, Ross GF, Taylor RW, Turnbull DM, Lightowlers RN. Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659:232-9.
- Sokol RJ, Treem WR. Mitochondria and childhood liver diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 4-16.
- Solaini G, Harris DA, Lenaz G, Sgarbi G, Baracca A. The study of the pathogenic mechanism of mitochondrial diseases provides information on basic bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777:941-5.
- Special Writing Group of the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young of the American Heart Association -Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones criteria, 1992 update. *JAMA* 1992; 268: 2069-73.
- Spencer CT, Bryant RM, Day J, Gonzalez IL, Colan SD, Thompson WR, et al. Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome. *Pediatrics* 2006; 118:337-46.
- Sperl W, Skladal D, Gnaiger E, Wyss M, Mayr U, Hager J, et al. High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Mol Cell Biochem* 1997; 174:71-8.
- Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene* 2005; 354:162-8.
- Stacpoole PW, Bunch ST, Neiberger RE, Perkins LA, Quisling R, Hutson AD, et al. The importance of cerebrospinal fluid lactate in the evaluation of congenital lactic acidosis. *Pediatr* 1999; 134:99-102.
- Stacpoole PW, Gilbert LR, Neiberger RE, Carney PR, Valenstein E, Theriaque DW, et al. Evaluation of long-term treatment of children with congenital lactic acidosis with dichloroacetate. *Pediatrics* 2008;121:1223-8.
- Stata: Data Analysis and Statistical Software, 6.0
- Statistical Package for the Social Sciences: SPSS 16.0
- Stryer L. Integration of Metabolism. In: Stryer editor. *Biochemistry*. 4th ed. New York: Freeman and Company, 1995:763-84.
- Sue CM, Hirano M, DiMauro S, De Vivo DC. Neonatal presentations of mitochondrial metabolic disorders. *Semin Perinatol* 1999; 23:113-24.
- Sue CM, Tanji K, Hadjigeorgiou G, Andreu AL, Nishino I, Krishna S, et al. Maternally inherited hearing loss in a large kindred with a novel T7511C mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Ser(UCN)) gene. *Neurology* 1999; 52:1905-8.

- Sutovsky P, Van Leyen K, McCauley T, Day BN, Sutovsky M. Degradation of paternal mitochondria after fertilization: implications for heteroplasmy, assisted reproductive technologies and mtDNA inheritance. *Reprod Biomed Online* 2004; 8:24-33.
- Svistunenko DA, Davies N, Brealey D, Singer M, Cooper CE. Mitochondrial dysfunction in patients with severe sepsis: an EPR interrogation of individual respiratory chain components *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757:262-72.
- Symonds ME, Mostyn A, Pearce S, Budge H, Stephenson T. Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J Endocrinol* 2003; 179(3):293-9.
- Taanman JW, Muddle JR, Muntau AC. Mitochondrial DNA depletion can be prevented by dGMP and dAMP supplementation in a resting culture of deoxyguanosine kinase-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet* 2003;12:1839 –1845.
- Taivassalo T, Gardner JL, Taylor RW, Schaefer AM, Newman J, Barron MJ, et al. Endurance training and detraining in mitochondrial myopathies due to single large-scale mtDNA deletions. *Brain* 2006; 129:3391-401.
- Taivassalo T, Shoubridge EA, Chen J, Kennaway NG, DiMauro S, Arnold DL, et al. Aerobic conditioning in patients with mitochondrial myopathies: physiological, biochemical, and genetic effects. *Ann Neurol*. 2001;50:133-41.
- Tarnopolsky MA, Roy BD, MacDonald JR. A randomized controlled trial of creatine monohydrate in patients with mitochondrial cytopathies. *Muscle Nerve* 1997; 20:1502-9.
- Taylor RW, Birch-Machin MA, Bartlett K, Turnbull DM. Succinate-cytochrome c reductase: assessment of its value in the investigation of defects of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1181:261-265.
- Taylor RW, Schaefer AM, McFarland R, Maddison P, Turnbull DM. A novel mitochondrial DNA tRNA(Ile) (A4267G) mutation in a sporadic patient with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Disord* 2002; 12:659-64.
- Taylor RW, Schaefer AM, Barron MJ, McFarland R, Turnbull DM. The diagnosis of mitochondrial muscle disease. *Neuromuscul Disord* 2004; 14:237-45.
- Tessa A, Vilarinho L, Casali C, Santorelli FM. MtDNA-related idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:847-8.
- Tessa A, Giannotti A, Tieri L, Vilarinho L, Marotta G, Santorelli FM. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mDNA. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:147-9.
- Testa M, Navazio FM, Neugebauer J. Recognition, diagnosis, and treatment of mitochondrial myopathies in endurance athletes. *Curr Sports Med Rep* 2005; 4:282-7.
- Tieu K, Przedborski S. Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative disorders. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 279-307.
- Tiranti V, Munaro M, Sandonà D, Lamantea E, Rimoldi M, DiDonato S, et al. Nuclear DNA origin of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome: genetic evidence based on patient's-derived rho degrees transformants. *Hum Mol Genet* 1995; 4:2017-23.
- Thomson AR, Miles BJ. Ion-exchange chromatography of amino-acids: improvements in the single column system. *Nature* 1964; 203: 483-4.
- Thorburn DR, Smeitink J. Diagnosis of mitochondrial disorders: clinical and biochemical approach. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24:312-6.
- Thorburn DR, Dahl HH. Mitochondrial disorders: genetics, counselling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 2001; 106:102-14.

- Thorburn DR. Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:349-62.
- Thorburn DR, Chow CW, Kirby DM. Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. *Mitochondrion* 2004a; 4:363-75.
- Thorburn DR, Sugiana C, Salemi R, Kirby DM, Worgan L, Ohtake A. Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Biochim Biophys Acta* 2004b; 1659:121-8.
- Touati G, Rigal O, Lombès A, Frachon P, Giraud M, Ogier de Baulny H. In vivo functional investigations of lactic acid in patients with respiratory chain disorders. *Arch Dis Child* 1997; 76:16-21.
- Touati G, Huber J, Saudubray JM. Diagnostic Procedures: Function Tests and Postmortem Protocol. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases- Diagnosis and Treatment*. 4th ed. Heidelberg: Medizin Verlag Springer, 2006:59-78.
- Torbergesen T, Oian P, Mathiesen E, Borud O. Pre-eclampsia - a mitochondrial disease? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1989;68:145-8.
- Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, et al. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1107-21.
- Towbin JA. Mitochondrial cardiology. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 75-103.
- Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H, Andreasson S, Ponjavic V, Dahl A, Stevenson RE, May M, Arena F, Barker D, et al. A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet* 1995;32:257-63.
- Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 1996; 264:484-509.
- Truscott KN, Brandner K, Pfanner N. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*. 2003; 13:326-37.
- Tsao CY, Herman G, Boue DR et al. Leigh disease with mitochondrial DNA A8344G mutation: case report and brief review. *J Child Neurol* 2003; 18:62-4.
- Tune BM, Sibley RK, Hsu CY. The mitochondrial respiratory toxicity of cephalosporin antibiotics. An inhibitory effect on substrate uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 245:1054-9.
- Turconi AC, Benti R, Castelli E et al. Focal cognitive impairment in mitochondrial encephalomyopathies: a neuropsychological and neuroimaging study. *J Neurol Sci* 1999; 170:57-63.
- Ueno M, Oka A, Maegaki Y, Toyoshima M, Fujiwaki T, Takeshita K. Mitochondrial DNA T to G mutation 8993 in Leigh encephalopathy and organic aciduria. *No To Hattatsu* 2001; 33:276-9.
- Uusimaa J, Remes AM, Rantala H, Vainionpaa L, Herva R, Vuopala K, et al. Childhood encephalopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics* 2000; 105:598-603.
- Uusimaa J, Finnila S, Remes AM, Rantala H, Vainionpaa L, Hassinen IE, et al. Molecular epidemiology of childhood mitochondrial encephalomyopathies in a Finnish population: sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNAArg, tRNAGlu, and tRNALeu(UUR) genes. *Pediatrics* 2004; 114:443-50.

- Valentino ML, Martí R, Tadesse S, López LC, Manes JL, Lyzak J, et al. Thymidine and deoxyuridine accumulate in tissues of patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *FEBS Lett.* 2007 ; 581:3410-4.
- Van den Heuvel LP, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Biochemical examination of fibroblasts in the diagnosis and research of oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects. *Mitochondrion* 2004; 4:395-401.
- Van Ekeren GJ, Stadhouders AM, Smeitink JA, Sengers RC. A retrospective study of patients with the hereditary syndrome of congenital cataract, mitochondrial myopathy of heart and skeletal muscle and lactic acidosis. *Eur J Pediatr* 1993; 152:255-9.
- Van Goethem G, Mercelis R, Löfgren A, Seneca S, Ceuterick C, Martin JJ, et al. Patient homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF. *Neurology* 2003; 61:1811-3.
- Van Maldergem L, Trijbels F, DiMauro S, Sindelar PJ, Musumeci O, Janssen A, et al. Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Ann Neurol* 2002; 52:750-4.
- Van Wouwe JP. Carnitine deficiency during valproic acid treatment. *Int J Vitam Nutr Res* 1995; 65(3): 211-4.
- Vassault A, Bonnefont JP, Specola N, Saudubray JM. Lactate, Pyruvate and Ketone Bodies. In: Hommes FA editor. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. New York: Wiley-Liss Inc, 1991: 285-308.
- Ventura FV, Ruiter J, Ijlst L, de Almeida IT, Wanders RJ. Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab* 2005; 86:344-52.
- Vilarinho L, Santorelli FM, Rosas MJ, Tavares C, Melo-Pires M, DiMauro S. The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy. *J Med Genet.* 1997a;34:607-9.
- Vilarinho L, Maia C, Coelho T, Coutinho P, Santorelli FM. Heterogeneous presentation in Leigh syndrome. *J Inherit Metab Dis* 1997b;20:704-5.
- Vilarinho L, Santorelli FM, Cardoso ML, Coelho T, Guimarães A, Coutinho P. Mitochondrial DNA analysis in ocular myopathy. Observations in 29 Portuguese patients. *Eur Neurol* 1998; 39:148-53.
- Vilarinho L, Chorão R, Cardoso ML, Rocha H, Nogueira C, Santorelli FM. The ND1 T3308C mutation may be a mtDNA polymorphism. Report of two Portuguese patients. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22:90-1.
- Vilarinho L, Leão E, Barbot C, Santos M, Rocha H, Santorelli FM. Clinical and molecular studies in three Portuguese mtDNA T8993G families. *Pediatr Neurol* 2000; 22:29-32.
- Visapää I, Fellman V, Vesa J, Dasvarma A, Hutton JL, Kumar V, et al. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am J Hum Genet* 2002; 71:863-76.
- Vogel H. Mitochondrial myopathies and the role of the pathologist in the molecular era. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 217-27.
- Von Kleist-Retzow JC, Cormier-Daire V, Viot G, Goldenberg A, Mardach B, Amiel J, et al. Antenatal manifestations of mitochondrial respiratory chain deficiency. *J Pediatr* 2003; 143:208-12.
- Vondracek P, Hermanova M, Vodickova K, Fajkusova L, Blakely EL, He L, et al. An unusual case of congenital muscular dystrophy with normal serum CK level, external ophthalmoplegia, and white matter changes on brain MRI. *Eur J Paediatr Neurol* 2007; 11:381-4.
- Wada H, Nishio H, Nagaki S, Yanagawa H, Imamura A, Yokoyama S, et al. Benign infantile mitochondrial myopathy caused by reversible cytochrome c oxidase deficiency. *No To Hattatsu* 1996; 28:443-7.

- Walker UA, Collins S, Byrne E. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur Neurol* 1996; 36:260-7.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242: 1427-30.
- Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999; 238:211-30.
- Wallace DC. Mouse models for mitochondrial disease. *Am J Med Genet* 2001; 106:71-93.
- Wardell TM, Ferguson E, Chinnery PF, Borthwick GM, Taylor RW, Jackson G, et al. Changes in the human mitochondrial genome after treatment of malignant disease. *Mutat Res* 2003; 525:19-27.
- Weissig V. Targeted drug delivery to mammalian mitochondria in living cells. *Expert Opin Drug Deliv* 2005; 2:89-102.
- Weschler D. *Weschler Intelligence Scale for Children*. 3rd ed. Lisboa: CEGOC-TEA; 2003.
- White SL, Shanske S, McGill JJ, Mountain H, Geraghty MT, DiMauro S, et al. Mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993 show a lack of tissue- or age-related variation. *J Inher Metab Dis* 1999; 22:899-914.
- Wibom R, Hagenfeldt L, Von Döbeln U. Measurement of ATP production and respiratory chain enzyme activities in mitochondria isolated from small muscle biopsy samples. *Anal Biochem* 2002; 311:139-51.
- Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, et al. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1998; 156:65-72.
- Wiedemann FR, Vielhaber S, Schröder R, Elger CE, Kunz WS. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Anal Biochem* 2000; 279:55-60.
- William ML. Acetaminophen and the US acute liver failure study group: Lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 2004; 40: 6-9.
- Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA. Enzymic determination of D(-)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem J* 1962; 82:90-6.
- Willis JH, Capaldi RA, Huigsloot M, Rodenburg RJ, Smeitink J, Marusich MF. Isolated deficiencies of OXPHOS complexes I and IV are identified accurately and quickly by simple enzyme activity immunocapture assays. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787:533-8.
- Willis TA, Davidson J, Gray RG, Poulton K, Ramani P, Whitehouse W. Cytochrome oxidase deficiency presenting as birth asphyxia. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42:414-7.
- Woischnik M, Moraes CT. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res* 2002; 12:885-93.
- Wolf NI, Smeitink JA. Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology* 2002; 59:1402-5.
- Wong LJ, Boles RG. Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta* 2005; 354:1-20.
- Wong LJ, Bai RK. Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA point mutation. *Methods Mol Biol* 2006; 335:187-200.
- Wong LJ, Brunetti-Pierri N, Zhang Q, Yazigi N, Bove KE, Dahms BB, et al. Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy. *Hepatology* 2007; 46:1218-27.

- Wortmann S, Rodenburg RJ, Huizing M, Loupatty FJ, de Koning T, Kluijtmans LA, et al. Association of 3-methylglutaconic aciduria with sensori-neural deafness, encephalopathy, and Leigh-like syndrome (MEGDEL association) in four patients with a disorder of the oxidative phosphorylation. *Mol Genet Metab* 2006; 88:47-52.
- Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB. Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 2757- 60.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000; 80:1107-213.
- Yano S, Li L, Le TP, Moseley K, Guedalia A, Lee J, et al. Infantile mitochondrial DNA depletion syndrome associated with methylmalonic aciduria and 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase deficiencies in two unrelated patients: a new phenotype of mtDNA depletion syndrome. *J Inherit Metab Dis* 2003; 26: 481-8.
- Yen TY, Hwu WL, Chien YH, Wu MH, Lin MT, Tsao LY, et al. Acute metabolic decompensation and sudden death in Barth syndrome: report of a family and a literature review. *Eur J Pediatr* 2008; 167:941-4.
- Yialamas MA, Groop LC, Mootha VK. Mitochondrial endocrinology. In: DiMauro S, Hirano M, Schon EA, editors. *Mitochondrial Medicine*. Abingdon: Informa Healthcare, 2006: 79-195.
- Zange J, Kornblum C, Müller K, Kurtscheid S, Heck H, Schröder R, et al. Creatine supplementation results in elevated phosphocreatine/adenosine triphosphate (ATP) ratios in the calf muscle of athletes but not in patients with myopathies. *Ann Neurol* 2002; 52:126.
- Zeviani M, Peterson P, Servidei S, Bonilla E, DiMauro S. Benign reversible muscle cytochrome c oxidase deficiency: a second case. *Neurology* 1987; 37:64-7.
- Zeviani M, Bertagnolio B, Uziel G. Neurological presentations of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis* 1996; 19:504-20.
- Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 2003;16:585-94.
- Zhang Y, Yang YL, Sun F, Cai X, Qian N, Yuan Y, et al. Clinical and molecular survey in 124 Chinese patients with Leigh or Leigh-like syndrome. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 265.
- Zheng XX, Shoffner JM, Voljavec AS, Wallace DC. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1019:1-10.

CAPÍTULO 9 – ANEXOS

9. ANEXOS

9.1 Classificação genética das doenças mitocondriais.

Classificação genética das DCRM	
I- Defeitos do mtDNA	
A) Mutações pontuais	
1 - Genes codificantes de proteínas	
<i>NARP</i> - T8993G/C	
<i>MILS</i> - T8993G/C	
<i>LHON</i> - G11778A, T14484C G3460A, A14495G	
2 - Genes tRNA	
<i>MERFF</i> - A8344G, T8356C	
<i>MELAS</i> - A3243G, T3271C, A3251G	
<i>CPEO</i> - A3243G, T4274C	
<i>Miopatia</i> - T14709C, A12320G	
<i>Miocardiopatia</i> - A3243G, A4269G, A4300G	
<i>Diabetes e surdez</i> - A3243G, C12258A	
<i>Surdez neurosensorial não síndrômica</i> - A7445G, T7511C (Sue et al., 1999)	
<i>Queratoderma palmoplantar</i> - A7445G (Sevior et al., 1998)	
<i>Encefalomiopatia</i> - G1606A, T10010C	
3 - Genes rRNA	
Surdez não síndrômica induzida pelos aminoglicosídeos -A1555G	
B) Rearranjos- deleções (grandes deleções parciais) e duplicações	
<i>Síndrome de Pearson, CPEO, KSS</i>	
<i>Diabetes e surdez</i>	
<i>Tubulopatia esporádica</i>	

Adaptado de: Chinnery, 2003; Smeitink et al., 2001b e Thorburn e Dahl, 2001.

As referências específicas estão assinaladas localmente.

II - Defeitos do nDNA
A) Genes que codificam subunidades dos complexos da CRM (complexos I e II)
Síndrome de Leigh Défice do complexo I – subunidades do complexo I (<i>NDUFS2, 4, 7 8</i> e <i>NDUFV1</i>); Défice do complexo II- subunidade flavoproteica do complexo II (<i>SDHA</i>)
Leucodistrofia e epilepsia mioclónica - subunidade do complexo I (<i>NDUFV1</i>)
Cardioencefalomiopatia - subunidade do complexo I (<i>NDUFS2; NDUFV2</i>) (Benit et al., 2003)
Atrofia óptica e ataxia - subunidade flavoproteica do complexo II (<i>SDHA</i>)
B) Genes que codificam proteínas auxiliares
- Defeitos de assembling (complexos III, IV e V)
Síndrome de Leigh - Proteína de <i>assembling</i> da COX (<i>SURF1</i>)
Síndrome de Leigh e tubulopatia proximal - Proteína de <i>assembling</i> da COX (<i>COX10</i>)
Cardioencefalomiopatia Proteína de <i>assembling</i> da COX (<i>SCO2</i>); Proteína de <i>assembling</i> da COX (<i>COX15</i>) (Antonicka H et al., 2003)
Insuficiência hepática e encefalopatia Proteína de <i>assembling</i> da COX (<i>SCO1</i>); Proteína de estabilidade do mRNA da COX (<i>LRPPRC</i>)
Tubulopatia, encefalopatia e insuficiência hepática - Proteína de <i>assembling</i> do complexo III (<i>BCSL1</i>)
Encefalopatia - Proteína de <i>assembling</i> do complexo V - ATPase12 (De Meirleir et al., 2004)
- Defeitos na síntese de proteínas ribossômicas (Kenmochi et al., 2001)
Acidose láctica neonatal fatal - proteína MRPS16 (Miller et al., 2004)
C) Alterações da comunicação intergenômica/ estabilidade do mtDNA
Oftalmoplegia externa autossômica dominante (adPEO), - mutações no transportador/ translocador de nucleótidos de adenina (<i>ANT1</i>) - mutações na DNA polimerase-gama (<i>POLG</i>); - mutações na helicase Twinkle (<i>C10orf2</i>)
MNGIE – mutação na timidina fosforilase (<i>TP</i>)
Miopatia com depleção do mtDNA - mutações na timidina kinase (<i>TK2</i>)
Encefalopatia com insuficiência hepática - mutações na desoxiguanosina kinase (<i>DGUOK</i>)
D) Alterações da importação mitocondrial de proteínas
Distonia-surdez - mutações na proteína DDP1 (<i>TIMM8A</i>)
E) Alterações do meio lipídico (membranar)
Síndrome de Barth – défice da síntese de cardiolipina por mutação no gene da tafazina (<i>TAZ</i>)
F) Alterações da homeostase mitocondrial (mutações que afectam a função da CRM)
Ataxia de Friedreich - <i>FRDA</i>
Paraplegia espástica familiar - <i>SPG7</i>
Doença de Wilson - <i>ATP7B</i>
Anemia sideroblástica e ataxia lig.X - <i>ABC7</i> (putativo gene de transporte do ferro) (Allikmets et al., 1999)
G) Alterações da fusão e motilidade
Fusão: Atrofia óptica dominante – gene da GTPase relacionada com dinamina (<i>OPA1</i>); Charcot-Marie-Tooth tipo 2 - gene da mitofusina 2 (fusão) (<i>MFN2</i>) (Banchs et al., 2008)
Motilidade: Paraplegia espástica familiar autossômica dominante - gene de uma das cinesinas (<i>KIF5A</i>)

Adaptado de: Chinnery, 2003; Smeitink et al., 2001b e Thorburn e Dahl, 2001.

As referências específicas estão assinaladas localmente.

9.2 Alterações do DNA mitocondrial investigadas

Tabela 40 - Alterações do mtDNA pesquisadas no início do estudo.

Tipo de alteração do mtDNA
Delecções (CPEO, S. Pearson, KSS)
A3243G (<i>MELAS</i>)
T3271C (<i>MELAS</i>)
G3460A (<i>LHON</i>)
A8344G (<i>MERRF</i>)
T8356C (<i>MERRF</i>)
G11778A (<i>LHON</i>)
T14484C (<i>LHON</i>)
G15257A (<i>LHON</i>)

Tabela 41 - Delecções pesquisadas até 2004.

Delecções do mtDNA
Delecções 13-2,5 Kb entre 500 e 16200; <i>XL-PCR</i>
Delecções 14,5-5,5 Kb entre 500 e 16200; <i>L-PCR</i>
Delecções 5,3-2,3 Kb entre 8200 e 13700
Delecções 7,3-4,3 Kb entre 7200 e 14700
Delecções 12,8-9,8 Kb entre 3200 e 16200
Delecções 7,8-4,8 Kb entre 8000 e 16200
Delecções 8,5-5,5 Kb entre 6000 e 14700

Abreviatura: Kb- kilobases

Tabela 42 - Mutações pesquisadas até 2004.

Mutações do mtDNA
A1555G, ARNr 12S (Surdez não síndrômica / aminoglicosídeos)
A3243G, ARNt ^{Leu (UUR)} (<i>MELAS</i>)
T3256C, ARNt ^{Leu (UUR)} (<i>MELAS, CPEO</i>)
A3260G, ARNt ^{Leu (UUR)} (<i>MELAS, Miopatia, Miopatia e miocardiopatia</i>)
T3271C; delT, ARNt ^{Leu (UUR)} (<i>MELAS</i>)
A3302G, ARNt ^{Leu (UUR)} (Miopatia)
G3460A, ND1 (<i>LHON</i>)
T4216C, ND1 (<i>LHON</i>)
A4917G, ND2 (<i>LHON</i>)
A7445G ARNt ^{Ser} (<i>Surdez neurosensorial</i>)
A8344G, ARNt ^{Lys} (<i>MERRF</i>)
T8356C, ARNt ^{Lys} (<i>MERRF, MELAS</i>)
G8363A, ARNt ^{Lys} (<i>MERRF, Miopatia e miocardiopatia, CPEO</i>)
T8993G/C, ATPase 6 (<i>NARP, MILS</i>)
T9176C, ATPase 6 (<i>FBSN- necrose estriatal bilateral familiar</i>)
G11778A, ND4 (<i>LHON</i>)
G14459A, ND6 (<i>LHON, Distonia</i>)
T14484C, ND6 (<i>LHON</i>)
T14709C ARNt ^{Glu} (Miopatia, Diabetes)
G15257A, Cyt b (<i>LHON</i>)

Tabela 43 - Deleções do mtDNA pesquisadas a partir de 2005.

Rastreamento de deleções do mtDNA
3150 – 14704
3150 – 16192
3150 – 16406
7241 – 14704
8222 – 13727
8222 – 16192

Tabela 44 - Mutações do mtDNA pesquisadas a partir de 2005.

Rastreo de mutações e deleções do mtDNA			
* Posição dos nucleótidos no mtDNA			
Região investigada*	Mutações pontuais	Doenças associadas	Status
1435 - 1917	A1438G	Diabetes Mellitus	r/t RNA M (Prov)
	G1462A	Diabetes/ Surdez	PRNP
	C1494T	Surdez	r/t RNA M (Prov)
	C1508T		PRCod
	C1531T		PRCod
	A1536G		PRCod
	C1537T		PRCod
	A1555G	Surdez	r/t RNA M (Cfrm)
	G1598A		PRCod
	A1603G		PRCod
	G1606A	Ataxia Mioclónus e Surdez (AMDF)	r/t RNA M (Prov)
	C1624T	Síndrome de Leigh	r/t RNA M (Prov)
	G1642A	Encefalomiopatia Mitoc. Ac.Láctica e Episódios tipo AVC (MELAS)	r/t RNA M (Prov)
	G1644T	Síndrome de Leigh do Adulto	r/t RNA M (Prov)
	G1664A		PRCod
	T1700C	Adenoma paratiroideu esporádico	PRCod, PRNP
	C1703T	Cancro da Mama	PRNP
	G1709A		PRCod
	G1719A		PRCod
	A1736G		PRCod
	C1764T		PRCod
	A1811G		PRCod
	T1822C		PRCod
	A1832G		PRCod
	A1842G		PRCod
	G1858A		PRCod
	G1888A		PRCod
	A1900G		PRCod
3150 – 3769	A3160T	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	C3184T		PRNP
	G3196A	D^a de Alzheimer e D^a de Parkinson (ADPD)	r/t RNA M (Prov)
	T3197C	Encefalomiopatia, Encefalopatia, Miocardiopatia	PRCod, PRNP
	C3206T	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	PRNP
	C3212T		PRCod
	G3242A	Síndrome mielodisplásico	PRNP
	A3243G	MELAS, Diabetes Mellitus/Surdez (DF), Miopatia Mitocondrial	r/t RNA M (Cfrm)
	A3243T	Miopatia Mitocondrial	r/t RNA M (Prov)
	G3249A	S. de Kearns-Sayre (KSS)	r/t RNA M (Prov)
	T3250C	Miopatia Mitocondrial /CPEO	r/t RNA M (Prov)
	A3251G	Miopatia Mitocondrial	r/t RNA M (Prov)
	T3252G	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	r/t RNA M (Prov)
	C3254G	Miopatia Mitocondrial	r/t RNA M (Prov)
	C3254T		PRCod
	C3256T	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	r/t RNA M (Cfrm)
	T3258C	Miopatia	r/t RNA M (Prov)
	A3260G	Miopatia e Miocardiopatia de Hereditariedade Materna (MMC)	r/t RNA M (Cfrm)
	T3264C	Diabetes Mellitus	r/t RNA M (Prov)
	T3271C	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	r/t RNA M (Cfrm)
	T3271C	Diabetes Mellitus	r/t RNA M (Prov)
	T3271delT	Encefalopatia Miopatia Progressiva (PEM)	r/t RNA M (Prov)
	T3273C	Miopatia ocular	r/t RNA M (Prov)
	C3275A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON)	r/t RNA M (Prov)
	G3277A		PRCod
	A3280G	Miopatia	r/t RNA M (Prov), PRCod
	A3288G	Miopatia	r/t RNA M (Prov)
	A3290G		PRCod
	T3291C	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	r/t RNA M (Prov)
	A3302G	Miopatia Mitocondrial	r/t RNA M (Cfrm)
	C3303T	Miopatia e Miocardiopatia de Hereditariedade Materna	r/t RNA M (Cfrm)
	T3308C	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	MPRCC (PM), PRCod
	G3316A	Diabetes Mellitus Não Insulino-Dependente (NIDDM), Neuropatia	MPRCC (Unclear)

		Óptica Hereditária de Leber, Oftalmoplegia Externa Progressiva (PEO)	
(3150 – 3769)	T3335C		PRCod
	T3336C		PRCod
	T3338C		PRCod
	A3348G		PRCod
	T3350C		PRCod
	C3351T	Síndrome cardio-facio-cutâneo desconhecido	PRNP
	A3360G	Leucodistrofia	PRNP
	A3378G		PRCod
	A3384G		PRCod
	G3391A		PRCod
	T3394C	Diabetes <i>Mellitus</i> Não Insulino-Dependente (NIDDM), Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Unclear), PRCod
	T3396C		PRCod
	A3397G	D^a de Alzheimer e D^a de Parkinson	MPRCC (Prov)
	A3397G	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	T3398C		PRCod
	A3411G		PRCod
	G3423T		PRCod
	G3424T		PRCod
	A3426G		PRCod
	C3429T		PRCod
	A3434G		PRCod
	G3438A		PRCod
	A3447G		PRCod
	C3450T		PRCod
	C3453T		PRCod
	C3459T		PRCod
	G3460A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Cfm*)
	A3465T		PRCod
	A3480G		PRCod
	G3483A		PRCod
	G3496T	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov/2^a)
	C3497T	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov/2^a)
	A3505G		PRCod
	G3531A	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica (NAION)	PRNP
	A3537G		PRCod
	C3546A		PRCod
	A3547G	Cancro do Pâncreas	PRNP
	T3552A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	PRNP
	3566insC	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	G3591A	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	C3594T	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica	PRCod, PRNP
	C3630T		PRCod
	G3635A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	G3635A	Cancro do Pâncreas	PRNP
	T3645C	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	PRNP
	C3657G		PRCod
	C3657A		PRCod
	G3666A		PRNP
	G3670A	Cancro do Pâncreas	PRNP
	C3674T		PRCod
	A3676C		PRCod
	G3693A		PRNP
	A3714G		PRCod
	C3738T		PRCod
	C3741T	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	PRNP
	C3738T	Neuropatia óptica isquémica anterior não arterítica	PRNP
4074 – 4703	C4086T		PRCod
	G4092A	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica	PRNP
	A4104G	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica	PRNP
	T4117C	Miocardíopatia Hipertrófica de Hereditariedade Materna (MHCM)	PRCod
	A4136G	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	C4140T		PRCod
	A4143G		PRCod
	C4155A		PRCod
	T4160C	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	A4164G	Cancro do Ovário, outras	PRCod
	C4167T		PRCod

(4074 – 4703)	T4169C		PRCod
	C4170A		PRCod
	C4171A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	Prov
	T4172C	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	C4185T		PRCod
	A4188G	Adenoma paratiroideu esporádico	PRCod, PRNP
	A4200T		PRCod
	T4216C	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Cfrm**)
	T4216C	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	C4242T		PRCod
	T4247C		PRCod
	T4248C		PRCod
	A4257G	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica	PRNP
	A4269G	Miocardiopatia Fatal Infantil Plus (associada a MELAS) (FICP)	r/t RNA M (Prov)
	T4274C	Oftalmoplegia Crónica Externa Progressiva (CPEO)	r/t RNA M (Prov)
	T4284A	Apresentação familiar variada	r/t RNA M (Prov)
	T4285C	Oftalmoplegia Crónica Externa Progressiva	r/t RNA M (Prov)
	A4295G	Miocardiopatia Hipertrófica de Hereditariedade Materna	r/t RNA M (Prov), PRCod
	G4298A	Oftalmoplegia Crónica Externa progressiva/ Esclerose Múltipla (MS)	r/t RNA M (Prov)
	A4300G	Miocardiopatia de Hereditariedade Materna (MICM)	r/t RNA M (Prov)
	G4309A	Oftalmoplegia Crónica Externa Progressiva	r/t RNA M (Prov)
	C4312T		PRCod
	A4315G	Atraso psicomotor	PRNP
	A4317G	Miocardiopatia Fatal Infantil Plus	r/t RNA M (Prov)
	C4318G		PRCod
	C4320T	Encefalomiocardiopatia mitocondrial	r/t RNA M (Prov)
	G4332A	Encefalopatia/MELAS	r/t RNA M (Cfrm)
	T4336C	D^a de Alzheimer e D^a de Parkinson	r/t RNA M (Unclear)
	A4343G		PRCod
	4370insA	Miopatia	r/t RNA M (Prov)
	T4386C		PRCod
	T4409C	Miopatia Mitocondrial	r/t RNA M (Prov)
	T4418C	Adenoma paratiroideu esporádico	PRCod, PRNP
	G4450A	Miopatia	r/t RNA M (Prov)
	T4472C		PRCod
	G4491A		PRCod
	A4529T		PRCod
	C4544T		PRCod
	G4580A		PRCod
	A4583G		PRCod
	T4592C		PRCod
	A4602G		PRCod
	A4626G		PRCod
	T4634C		PRCod
	T4639C		PRCod
	C4640A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	C4640A	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	T4646C		PRCod
	G4655A		PRCod
	A4657G		PRCod
	G4659A		PRCod
	T4695C		PRCod
	T4703C		PRCod
4886 – 5021	T4911C		PRCod
	A4917G	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Cfrm**)
	A4918G		PRCod
	G4924A		PRCod
	C4931G		PRCod
	T4945C		PRCod
	A4958G		PRCod
	G4959C		PRCod
	A4961G		PRCod
	T4977C	Cancro do Pâncreas	PRNP
	G4985A		PRCod
	G4991A		PRCod
	T5004C	Cancro do Pâncreas	PRNP
7241 – 7644	A7250G		PRCod
	T7251C		PRCod

(7241 – 7644)	C7256T	Normal	PRCod, PRNP
	C7274T		PRCod, PRNP
	A7307G		PRCod
	G7337A		PRCod
	T7389C	Sem informação	PRNP
	C7402T		PRCod
	A7403G		PRCod
	A7424G		PRCod
	A7430G		PRCod
	A7443G	Surdez	r/t RNA M (Prov)
	G7444A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber, Surdez neurosensorial (SNHL)	MPRCC (Prov), r/t RNA M (Prov)
	A7445C	Surdez	Prov
	A7445G	Surdez neurosensorial	r/t RNA M (Cfrm)
	7472insC	Encefalomiopatia Progressiva/ Ataxia Mioclónus e Surdez	r/t RNA M (Cfrm)
	C7476T	Normal / várias doenças mitocondriais	PRCod
	G7497A	Miopatia Mitocondrial	r/t RNA M (Prov)
	T7510C	Surdez neurosensorial	r/t RNA M (Prov)
	T7511C	Surdez neurosensorial	r/t RNA M (Cfrm)
	T7512C	Encefalomiopatia Progressiva /MERRF+MELAS (MERME)	r/t RNA M (Prov)
	G7521A	Normal / várias doenças mitocondriais	PRCod
	A7543G	Epilepsia Mioclónica e Regressão Psicomotora (MEPR)	r/t RNA M (Prov)
	T7579C		PRCod
	T7581C		PRCod
	T7587C	Encefalopatia mitocondrial	Prov
	G7600A		PRCod
	A7617C		PRCod
	T7621C		PRCod
	C7626T		PRCod
	G7642A		PRCod
8222 – 8461	A8245G		PRCod
	G8249A		PRCod
	G8251A	Normal and Several Mitochondrial diseases	PRCod
	C8252T		PRCod
	T8260C		PRCod
	G8269A	Normal and Several Mitochondrial diseases	PRCod
	T8277C		PRCod
	G8290A		PRCod
	G8292A		PRCod
	A8296G	Diabetes Mellitus e Surdez (DMDF)/ Epilepsia Mioclónica e Fibras Vermelhas Rotas / Miocardiopatia Hipertrófica	r/t RNA M (Prov)
	A8308G		PRCod
	G8313A	Encefalopatia Mio-Neuro-GastroIntestinal (MNGIE)	r/t RNA M (Prov)
	C8320T	Encefalopatia	r/t RNA M (Unclear)
	G8328A	Encefalopatia mitocondrial	r/t RNA M (Prov)
	T8337C		PRCod
	G8342A	Oftalmoplegia Externa Progressiva e Mioclónus	r/t RNA M (Prov)
	A8344G	Epilepsia Mioclónica e Fibras Vermelhas Rotas (MERRF)	r/t RNA M (Cfrm)
	A8348G	Miocardiopatia	r/t RNA M (Prov), PRCod
	T8355C	Miopatia	r/t RNA M (Prov)
	T8356C	Epilepsia Mioclónica e Fibras Vermelhas Rotas	r/t RNA M (Cfrm)
	G8361A	Epilepsia Mioclónica e Fibras Vermelhas Rotas	r/t RNA M (Prov)
	T8362G	Miopatia	r/t RNA M (Prov)
	G8363A	Miocardiopatia de Hereditariedade Materna +Surdez /MERFF	r/t RNA M (Prov)
	C8386T	Neuropatia óptica isquémica anterior não arterítica	PRNP
	G8392A		PRCod
	C8414T	Epilepsia Mioclónica e Fibras Vermelhas Rotas	PRCod, PRNP
	T8415C		PRCod
	T8426C		PRCod
	T8427C		PRCod
	C8428T		PRCod
	C8431T	Epilepsia Mioclónica e Fibras Vermelhas Rotas	PRNP
	A8435G		PRCod
	T8448C		PRCod
	T8450C		PRCod
8915 – 9413	C8932T	Encefalomiopatia, Atraso Mental, Oftalmoplegia, Insuficiência Suprarenal	PRNP
	A8938G		PRCod
	A8953G	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP

(8915 – 9413)	T8957C	Cancro do Pâncreas	PRNP
	C8964T		PRCod
	A8982G		PRCod
	T8987C	Adenoma paratiroideu esporádico	PRCod, PRNP
	G8989A		PRCod
	T8993C	Fraqueza muscular Neurogénica, Ataxia e Retinite Pigmentar (NARP) / S. de Leigh	MPRCC (Cfrm)
	T8993G	Fraqueza muscular Neurogénica, Ataxia e Retinite Pigmentar / S. de Leigh	MPRCC (Cfrm)
	G8994A	Sem doenças	PRCod
	A9007G	Encefalomiopatia Mitoc., Ac. Láctica e Episódios tipo AVC -like	PRNP
	C9027G		PRCod
	A9052G		PRCod
	G9053A	Normal	PRNP
	G9055A	Infertilidade	PRNP
	T9101C	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	G9123A		PRCod
	T9128C		PRCod
	A9132G		PRCod
	A9150G	Controlo	PRCod, PRNP
	G9163A		PRCod
	T9176C	Necrose estriatal Bilateral familiar (FBSN)/ S. de Leigh	MPRCC (Cfrm)
	T9176G	S. de Leigh	MPRCC (Prov)
	A9180G		PRCod
	A9181G		PRCod
	G9192A		PRCod
	G9196A		PRCod
	A9214G		PRCod
	A9221G		PRCod
	A9246G		PRCod
	A9251G		PRCod
	A9254G	Miopatia, Cancro do Fígado	PRCod, PRNP
	C9270T		PRCod
	C9293T	Oftalmoplegia, Surdez	PRCod
	C9296T		PRCod
	A9299G		PRCod
	G9300A	Miopatia	PRNP
	T9316C		PRCod
	C9365T		PRCod
	A9377G	Infertilidade	PRCod, PRNP
	G9380A	Miopatia, Infertilidade	PRNP
	A9392G		PRCod
	A9395G		PRCod
	A9410G	Miopatia	PRNP
11719 – 11819	G11719A	Cancro da Boca	PRCod, PRNP
	T11722C		PRCod
	A11723G	Cancro da Mama	PRNP
	T11732C		PRNP
	A11734G	Cancro da Mama	PRNP
	C11761T	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica	PRNP
	C11761T		PRCod
	G11762A		PRCod
	C11777A	S. de Leigh	MPRCC (Prov)
	G11778A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Cfrm*)
	C11779T		PRCod
	C11788T		PRCod
	A11797delA	Cancro da Boca	PRNP
	C11808A	Normal	PRNP
	A11812G		PRCod
	A11818C	Normal	PRNP
13515 – 13727	A13528G	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber - like	MPRCC (Prov)
	C13545T		PRCod
	A13563G		PRCod
	T13577C	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	G13590A		PRCod
	C13596G		PRCod
	T13617C		PRCod
	A13637G		PRCod
	C13650T	Cancro do Ovário	PRCod
	T13656C		PRCod

(13515 – 13727)	C13692A		PRCod
	G13702C		PRCod
	C13704T		PRCod
	G13707A		PRCod
	G13708A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Cfrm**)
	G13708A	Adenoma paratiroideu esporádico	PRNP
	A13710G		PRCod
	A13716G		PRCod
	A13722G		PRCod
14420 – 14855	A14422G		PRCod
	G14453A	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	MPRCC (Prov)
	G14459A	S. de Leigh e Distonia (LYDT)/ S. de Leigh	MPRCC (Cfrm)
	T14470A		PRCod
	T14470C	Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	PRCod, PRNP
	C14482A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	C14482G	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Cfrm)
	T14484C	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Cfrm)
	C14485T		PRCod
	T14487C	S. de Leigh	MPRCC (Prov)
	T14488C		PRCod
	A14495G	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	A14497G		PRCod
	T14498C	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	T14502C		PRCod
	A14527T		PRCod
	G14544A		PRCod
	T14551C		PRCod
	G14560A		PRCod
	C14562T		PRCod
	A14564G		PRCod
	A14566G		PRCod
	C14568T	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	G14569A		PRCod
	A14572G		PRCod
	T14577C		PRCod
	A14582G	Normal, Cancro do Pâncreas	PRCod, PRNP
	A14587G		PRCod
	A14596T	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Prov)
	G14620A		PRCod
	A14666G	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica	PRNP
	C14668T		PRCod
	T14674C		PRCod
	A14687G		PRCod
	A14693G		PRCod
	T14709C	Miopatia Mitocondrial + Diabetes Mellitus	r/t RNA M (Cfrm)
	A14750G		PRCod
	A14755T		PRCod
	A14755G		PRCod
	T14757C		PRNP
	T14766C		PRCod
	A14768G		PRNP
	A14769C		PRCod
	C14770T		PRCod
	A14776G		PRCod
	T14783C	Cancro da Mama	PRCod, PRNP
	TTAA14787del	D^a de Parkinson (PD), Encefalomiopatia Mitoc., Acidose Láctica e Episódios tipo AVC	MPRCC (Prov)
	T14788C		PRCod
	A14793G		PRNP
	T14798C		PRCod
	G14846A	Intolerância ao exercício	MPRCC (Prov)
	T14849C	Displasia septo-óptica	MPRCC (Prov), PRNP
15023 - 15450	C15028T		PRCod
	A15034G	Miopatia (Desconhecida), Ptose bilateral	PRNP
	C15040T		PRCod
	G15043A		PRCod
	G15045A	Cancro do Pâncreas	PRNP
	A15052G		PRCod
	C15058T		PRCod

(15023 – 15450)	G15059A	Miopatia Mitocondrial	MPRCC (Prov)
	T15067C		PRCod
	T15071C		PRCod
	G15084A	Intolerância ao exercício	MPRCC (Prov)
	C15088T	Miopatia	PRNP
	T15097C		PRCod
	G15106A		PRCod
	G15110A		PRCod
	T15115C	Miopatia Ocular	PRCod, PRNP
	G15148A	Adenoma paratiroideu esporádico	PRCod, PRNP
	G15150A	Intolerância ao exercício	MPRCC (Prov)
	G15168A	Intolerância ao exercício	MPRCC (Prov)
	T15191C		PRCod
	C15194T		PRCod
	T15197C	Intolerância ao exercício	MPRCC (Prov)
	C15199T		PRCod
	C15201G		PRCod
	A15203G		PRCod
	G15217A		PRCod
	A15218G		PRCod
	A15226G		PRCod
	G15227A		PRCod
	A15236G		PRCod
	G15242A	Encefalomiopatia mitocondrial	MPRCC (Prov)
	G15243A	Miocardiomatia Hipertrófica (HCM)	MPRCC (Prov)
	A15244G	Miopatia Ocular	PRCod, PRNP
	A15256C		PRCod
	G15257A	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber	MPRCC (Unclear)
	G15257A	Cancro da Mama	PRNP
	A15258G		PRCod
	C15265T	Neuropatia Óptica Isquémica Anterior Não Arterítica	PRNP
	G15301A		PRCod
	T15310C	Miopatia (Desconhecida), Ptose bilateral	PRNP
	T15313A		PRCod
	G15314A		PRCod
	G15317A		PRCod
	G15323A	Cancro do Fígado	PRNP
	A15326G		PRCod
	T15345C		PRCod
	G15346A		PRCod
	G15355A		PRCod
	C15367T		PRCod
	T15394C		PRCod
	A15422G		PRCod
	T15440C		PRCod

MPRCC -Reported *mtDNA* Base Substitution Disease: Coding and Control Region Point Mutations

r/t RNA M -Reported *mtDNA* Base Substitution Disease: rRNA/tRNA mutations

Cfrm* - Mutação primária de Leber (LHON); **Cfrm**** - Mutação secundária de Leber (LHON)

Cfrm - mais do que um grupo independente terá feito uma publicação acerca da patogenicidade da mutação (apesar de poder haver diferentes fenótipos clínicos) ou ocorrências independentes da mutação terão resultado num mesmo fenótipo. Dados adicionais serão necessários para confirmar a patogenicidade de algumas destas mutações

Prov - **Provisório**: indica que apenas um grupo de trabalho terá reportado a mutação como patogénica

Unclear - *pouco claro* (mutação 2ª ?, patogénica quando associada a outras mutações ?)

PM - **polimorfismo**: algumas publicações determinaram que a mutação é um polimorfismo não patogénico

PRC - *mtDNA* Control Region Sequence Polymorphisms; **PRCod** - *mtDNA* Coding Region Sequence Polimorfism **PRNP** - Unpublished *mtDNA* Polymorphisms

NC - Região não codificante; **NA** - Não aplicável por se encontrar num tRNA

9.3 Critérios de Bernier que levaram à classificação dos doentes

Tabela 45 - Critérios maiores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier.

Total		Clínicos												Hist	Enzimáticos				Mol	Lab	DF		
Cl	Lab	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	T	T	1	2	3	4	T	T	T	
b	d																1		4	1		1	D
d	e												1	1			1			1		1	D
c	f																1			1		1	D*
d	e		1											1			1			1		1	D
c	e																1			1		1	D
c	e																1			1		1	D
c	d																1			1		1	D*
a	e																1			1		1	D
d	e							1						1			1			1		1	D
c	e																1			1		1	D
b	d																1			1		1	D
d	e			1										1			1			1		1	D
a	e																1			1		1	D*
c	e																1			1		1	D
a	e																1			1		1	D
c	e																1			1		1	D
d	g		1											1			1			1	3	2	D
c	d																1			1		1	D
a	e																1			1		1	D*
c	e																1			1		1	D
d	e											1		1							2	1	D
c	d																1			1		1	D
a	e																1			1		1	D*
b	e																1			1		1	D
c	d																1			1		1	D*
c	e																1			1		1	D
b	d																1			1		1	D
d	e												1	1			1			1		1	D
d	h						1							1	1						1	2	D
b	d																1			1		1	D
c	d																1			1		1	D
a	e																1			1		1	D
d	g												1	1			1			1	3	2	D
d	e		1											1			1			1		1	D
a	f																1			1		1	D*
c	e																1			1		1	D
b	e																1			1		1	D
b	e																1			1		1	D*
b	e																1			1		1	D
b	e																1			1		1	D*
c	e																1			1		1	D
b	e																1			1		1	D
d	c												1	1									D
b	e																1			1		1	D
b	e																1			1		1	D
b	e																1			1		1	D
c	e																1			1		1	D*
b	e																1			1		1	D

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lab**- laboratorial; **T**-total; **Hist**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **mi**- minor **Mj**- major; **a**=1mi; **b**=2mi; **c** ≥3mi; **d**=1Mj; **e**=1Mj+1mi; **f**=1Mj+2mi; **g** =2Mj +1mi; **h**= 2Mj+2mi
DF- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**-improvável. (*)- secundário.

Crítérios majores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier (continuação).

Total		Clínicos												Hist	Enzimáticos					Mol	Lab	DF	
Cl	Lab	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	T	T	1	2	3	4	T	T	T	
a	f																1			1		1	D
d	b		1											1									D
a	e															1				1		1	D
c	f															1				1		1	D
c	e															1				1		1	D
c	d															1				1		1	D
a	e															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
c	e															1				1		1	D
a	e															1				1		1	D
b	e																	1	1			1	D*
d	g		1											1		1				1	2	2	D
b	e															1				1		1	D
a	e															1				1		1	D*
b	e															1				1		1	D
a	f															1				1		1	D
c	d															1				1		1	D*
a	e															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
c	g														1						1	2	D
a	e																1			1		1	D*
b	e															1				1		1	D*
c	e															1				1		1	D
c	e															1				1		1	D
a	e															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
b	d															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
b	d															1				1		1	D
a	e															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
a	e															1				1		1	D
c	e															1				1		1	D*
c	d															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
c	e															1				1		1	D
c	e															1				1		1	D
d	g		1											1		1				1	3	2	D
c	e															1				1		1	D
a	e															1				1		1	D
c	d															1				1		1	D
b	e															1				1		1	D
d	e					1								1							1	1	D
c	d															1				1		1	D*
c	b																						P*
a	b																						P
d	a		1											1									P*
b	a																						P

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lab**- laboratorial; -total; **Hist**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **mi**- minor **Mj**- major; **a**=1mi; **b**=2mi; **c** ≥3mi; **d**=1Mj; **e**=1Mj+1mi; **f**=1Mj+2mi; **g** =2Mj +1mi; **h**= 2Mj+2mi
DF- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**- improvável. (*)- secundário.

Crítérios majores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier (continuação).

Total		Clínicos													Hist	Enzimáticos					Mol	Lab	DF	
Cl	Lab	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	T		1	2	3	4	T		T		
c	a																							P
b	b																							P
b	b																							P
d	a		1											1										P
c	a																							P
c	b																							P
c	b																							P*
b	b																							P
a	b																							P
b	b																							P
c	a																							P
c	b																							P
c	a																							P
c	a																							P
b	a																							P
c	a																							P
b	a																							P*
c	b																							P
a	b																							P
b	a																							P
c	b																							P
c	a																							P*
b	a																							P
c	a																							P
b	a																							P
c	a																							P
b	b																							P
b	a																							P
b	b																							P
c	c																							P*
a	b																							P
b	b																							P
c	b																							P
c	a																							P
c	b																							P
c	a																							P
c	b																							P
c	a																							P
b	a																							P
c	a																							P
b	b																							P
c	a																							P
c	c																							P*
b	a																							P
b	a																							P
c	a																							P*
b	a																							P*
b	a																							P
c	b																							P
b	b																							P
a	d																1			1			1	P*

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lab**- laboratorial; **T**- total; **Hist**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **mi**- minor **Mj**- major; **a**=1mi; **b**=2mi; **c** ≥3mi; **d**=1Mj; **e**=1Mj+1mi; **f**=1Mj+2mi; **g** =2Mj +1mi; **h**= 2Mj+2mi
DF- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**- improvável. (*)- secundário.

Crítérios majores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier (continuação).

Total		Clínicos												Híst	Enzimáticos					Mol	Lab	DF		
Cl	Lab	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	T		1	2	3	4	T		T		
b	a																							P
a	b																							P
b	a																							P
b	b																							P
c	a																							P
c	b																							P
b	b																							P*
a	d															1				1			1	P*
c	b																							P
b	a																							P
c	a																							P*
a	b																							P*
c	c																							P
b	a																							P
c	a																							P
c	a																							P*
a	b																							P
c	c																							P
c	b																							P
c	a																							P*
b	b																							P
b	a																							P
a	a																							S
a	a																							S
a	a																							S
a	a																							S
a	a																							S*
a	a																							S
a	a																							S
d	0									1				1										S
a	a																							S
a	a																							S
c	0																							I
a	0																							I
b	0																							I*
0	0																							I
a	0																							I
b	0																							I
b	0																							I
c	0																							I
b	0																							I
a	0																							I*
c	0																							I
c	0																							I
0	a																							I*
b	0																							I*
b	0																							I
c	0																							I
c	0																							I
c	0																							I

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lab**- laboratorial; **T**-total; **Híst**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **mi**- minor **Mj**- major; **a**=1mi; **b**=2mi; **c** ≥3mi; **d**=1Mj; **e**=1Mj+1mi; **f**=1Mj+2mi; **g** =2Mj +1mi; **h**= 2Mj+2mi

DF- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**- improvável. (*)- secundário.

Tabela 46 - Critérios menores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier.

Total		Clínicos														Laboratoriais					DF
Cl	Lb	Neu	M	C	R	Nt	Hp	Ed	Hm	Ot	Of	D	Di	Out	T	Hist	Enz	Mol	Mb	T	
b	d	1				1									2						D
d	e																		1	1	D
c	f				1	1	1	1							4	1			1	2	D*
d	e																		1	1	D
c	e	1									1			1	3				1	1	D
c	e	1			1						1				3				1	1	D
c	d	1	1	1		1									4						D*
a	e	1													1				1	1	D
d	e																		1	1	D
c	e	1				1	1								3				1	1	D
b	d	1													2						D
d	e																		1	1	D
a	e						1								1				1	1	D*
c	e	1									1	1			3				1	1	D
a	e			1											1				1	1	D
c	e	1				1				1	1			1	5				1	1	D
d	g																		1	1	D
c	d	1		1		1									3						D
a	e			1											1				1	1	D*
c	e	1				1					1				3				1	1	D
d	e																		1	1	D
c	d	1	1				1								3						D
a	e	1													1				1	1	D*
b	e	1				1									2				1	1	D
c	d	1	1	1		1	1								5						D*
c	e	1				1							1		3				1	1	D
b	d	1													2						D
d	e																		1	1	D
d	h															1			1	1	D
b	d	1													2						D
c	d	1	1			1									3						D
a	e	1													1				1	1	D
d	g																		1	1	D
d	e																		1	1	D
a	f			1											1			1	1	2	D*
c	e	1	1	1											3				1	1	D
b	e	1									1				2				1	1	D
b	e			1			1								2				1	1	D*
b	e	1				1									2				1	1	D
b	e					1	1								2				1	1	D*
c	e	1				1					1				3				1	1	D
b	e	1									1				2				1	1	D
d	c																1	1	1	3	D
b	e	1					1								2				1	1	D
b	e			1		1									2				1	1	D
b	e	1	1												2				1	1	D
c	e	1				1					1				3				1	1	D*
b	e	1				1									2				1	1	D

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lb**- laboratorial; **Neur**- neurológico; **M**- muscular; **C**- cardíaco; **R**- renal; **NT**- nutricional; **Hp**- hepático; **Ed**- endócrino; **Hm**- hematológico; **Ot**- otológico; **Of**- oftalmológico; **D**- dermatológico; **Di**- dismórfico; **Out**- outros; **T**- total; **Hist**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **Mb**- metabólico; **mi**- minor **Mj**- major; **a**= 1mi; **b**= 2mi; **c** ≥ 3 mi; **d**=1Mj; **e** = 1Mj+1mi; **f**=1Mj+2mi; **g** = 2Mj+ 1mi; **h** = 2Mj+ 2mi **DF**- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**- improvável. (*)- secundário.

Crítérios menores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier (continuação).

Total		Clínicos														Laboratoriais					DF
Cl	Lb	Neu	M	C	R	Nt	Hp	Ed	Hm	Ot	Of	D	Di	Out	T	Hist	Enz	Mol	Mb	T	
a	f	1													1	1			1	2	D
d	b															1			1	2	D
a	e	1													1				1	1	D
c	f	1					1				1				3			1	1	2	D
c	e	1				1							1		3				1	1	D
c	d		1				1					1			3						D
a	e	1													1				1	1	D
b	e	1				1									2				1	1	D
c	e	1	1			1	1								4				1	1	D
a	e		1												1				1	1	D
b	e						1		1						2				1	1	D*
d	g																		1	1	D
b	e	1				1									2				1	1	D
a	e						1								1				1	1	D*
b	e	1				1									2				1	1	D
a	f	1													1		1	1	2		D
c	d	1				1					1			1	4						D*
a	e	1													1				1	1	D
b	e			1		1									2				1	1	D
b	e	1												1	2				1	1	D
c	g	1	1	1							1				4				1	1	D
a	e	1													1				1	1	D*
b	e	1					1								2				1	1	D*
c	e	1	1			1					1	1		1	6				1	1	D
c	e	1	1								1				3				1	1	D
a	e						1								1				1	1	D
b	e	1				1									2				1	1	D
b	d	1									1				2						D
c	e	1	1			1								1	4				1	1	D
b	d	1									1				2						D
b	e	1				1									2				1	1	D
b	d	1												1	2						D
a	e	1													1				1	1	D
b	e	1									1				2				1	1	D
a	e	1													1				1	1	D
c	e	1		1		1	1								4				1	1	D*
c	d	1		1			1								3						D
b	e	1												1	2				1	1	D
c	e	1				1					1			1	4				1	1	D
c	e	1	1	1		1									4				1	1	D
d	g																		1	1	D
c	e	1	1			1					1				4				1	1	D
a	e	1													1				1	1	D
c	d	1		1		1	1								4						D
b	e	1												1	2				1	1	D
d	e																		1	1	D
c	d	1	1			1									3						D*
c	b	1	1			1									3		1		1	2	P*
a	b	1													1		1		1	2	P
d	a																		1	1	P
b	a					1	1								2				1	1	P

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lb**- laboratorial; **Neur**- neurológico; **M**- muscular; **C**- cardíaco; **R**- renal; **NT**- nutricional; **Hp**- hepático; **Ed**- endócrino; **Hm**- hematológico; **Ot**- otológico; **Of**- oftalmológico; **D**- dermatológico; **Di**- dismórfico; **Out**- outros; **T**- total; **Hist**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **Mb**- metabólico; **mi**- minor **Mj**- major; **a**= 1mi; **b**= 2mi; **c** ≥3 mi; **d** =1Mj; **e** = 1Mj+1mi; **f** =1Mj+2mi; **g** = 2Mj+1mi; **h** = 2Mj+ 2mi
DF- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**- improvável. (*)- secundário.

Crítérios menores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier (continuação).

Total		Clínicos														Laboratoriais					DF
Cl	Lb	Neu	M	C	R	Nt	Hp	Ed	Hm	Ot	Of	D	Di	Out	T	Hist	Enz	Mol	Mb	T	
c	a	1				1	1						1		4				1	1	P
b	b	1				1									2		1		1	2	P
b	b	1									1				2	1			1	2	P
d	a																		1	1	P
c	a	1								1	1				3				1	1	P
c	b	1				1					1		1		4		1		1	2	P
c	b					1	1		1						3		1		1	2	P*
b	b	1				1									2		1		1	2	P
a	b	1													1		1		1	2	P
b	b	1				1									2	1			1	2	P
c	a	1	1			1									3				1	1	P
c	b	1				1	1					1			4		1		1	2	P
c	a	1				1					1				3		1			1	P
c	a	1				1					1				3	1				1	P
b	a	1								1					2				1	1	P
c	a	1	1			1								1	4				1	1	P
b	a	1				1									2				1	1	P*
c	b	1	1	1		1				1	1			1	7		1		1	2	P
a	b	1													1		1		1	2	P
b	a	1				1									2				1	1	P
c	b	1			1	1									3		1		1	2	P
c	a	1	1			1	1					1			5				1	1	P*
b	a	1				1									2			1		1	P
c	a	1								1				1	3				1	1	P
b	a	1				1									2				1	1	P
c	a	1				1						1			3				1	1	P
b	b	1									1				2		1		1	2	P
b	a	1				1									2				1	1	P
b	b	1				1									2			1	1	2	P
c	c	1					1	1							3		1	1	1	3	P*
a	b					1									1		1		1	2	P
b	b	1				1									2		1		1	2	P
c	b	1				1					1				3		1		1	2	P
c	a	1	1			1									3		1			1	P
c	b	1		1		1						1			4		1		1	2	P
c	a	1				1				1					3				1	1	P
c	b	1				1					1				3		1	1		2	P
c	a		1	1			1								3				1	1	P
b	a	1									1				2				1	1	P
c	a	1	1			1						1			4				1	1	P
b	b					1	1								2		1		1	2	P
c	a	1	1			1									3				1	1	P
c	c	1	1	1		1									4	1	1		1	3	P*
b	a	1				1									2				1	1	P
b	a	1												1	2				1	1	P
c	a	1				1		1							3				1	1	P*
b	a	1				1									2				1	1	P*
b	a	1									1				2				1	1	P
c	b	1	1			1				1	1	1			6		1		1	2	P
b	b	1											1		2		1		1	2	P
a	d	1													1						P*

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lb**- laboratorial; **Neur**- neurológico; **M**- muscular; **C**- cardíaco; **R**- renal; **NT**- nutricional; **Hp**- hepático; **Ed**- endócrino; **Hm**- hematológico; **Ot**- otológico; **Of**- oftalmológico; **D**- dermatológico; **Di**- dismórfico; **Out**- outros; **T**- total; **Hist**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **Mb**- metabólico; **mi**- minor **Mj**- major; **a**= 1mi; **b**= 2mi; **c** ≥3 mi; **d**=1Mj; **e**= 1Mj+1mi; **f**=1Mj+2mi; **g**= 2Mj+1mi; **h**= 2Mj+ 2mi
DF- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**- improvável. (*)- secundário.

Crítérios menores em 200 doentes segundo a classificação de Bernier(continuação).

Total		Clínicos														Laboratoriais					DF
Cl	Lb	Neu	M	C	R	Nt	Hp	Ed	Hm	Ot	Of	D	Di	Out	T	Hist	Enz	Mol	Mb	T	
b	a	1									1				2				1	1	P
a	b	1													1			1	1	2	P
b	a	1									1				2				1	1	P
b	b	1									1				2		1		1	2	P
c	a	1				1						1			3				1	1	P
c	b	1				1					1				3		1		1	2	P
b	b	1				1									2		1		1	2	P*
a	d	1													1						P*
c	b	1	1			1									3		1		1	2	P
b	a	1												1	2				1	1	P
c	a	1									1			1	3				1	1	P*
a	b													1	1		1		1	2	P*
c	c	1		1		1					1				4	1	1		1	3	P
b	a	1				1									2		1			1	P
c	a	1		1		1						1			4				1	1	P
c	a	1				1				1	1				4				1	1	P*
a	b	1													1		1		1	2	P
c	c	1				1					1		1		4	1	1		1	3	P
c	b	1				1				1					3		1		1	2	P
c	a	1	1			1									3				1	1	P*
b	b	1					1								2		1		1	2	P
b	a	1				1									2				1	1	P
a	a	1													1				1	1	S
a	a	1													1				1	1	S
a	a	1													1		1		1	1	S
a	a	1													1		1		1	1	S*
a	a					1									1		1		1	1	S
a	a	1													1				1	1	S
d	0																				S
a	a	1													1				1	1	S
a	a	1													1				1	1	S
c	0	1				1					1				3						I
a	0	1													1						I
b	0	1									1				2						I*
0	0																				I
a	0	1													1						I
b	0	1				1									2						I
b	0	1									1				2						I
c	0	1	1											1	3						I
b	0	1									1				2						I
a	0		1												1						I*
c	0	1	1			1				1					4						I
c	0	1				1				1					3						I
0	a																	1	1		I*
b	0	1	1												2						I*
b	0	1	1												2						I
c	0	1								1	1				3						I
c	0	1				1								1	3						I
c	0	1	1			1									3						I

Os dados de cada doente estão representados numa linha.

Abreviaturas: **Cl**- clínico; **Lb**- laboratorial; **Neur**- neurológico; **M**- muscular; **C**- cardíaco;**R**- renal; **NT**- nutricional; **Hp**- hepático; **Ed**- endócrino; **Hm**- hematológico; **Ot**- otológico; **Of**- oftalmológico; **D**- dermatológico; **Di**- dismórfico; **Out**- outros; **T**- total; **Hist**- histológico; **Enz**- enzimático; **Mol**- molecular; **Mb**- metabólico; **mi**- *minor* **Mj**- *major*; **a**= 1mi; **b**= 2mi; **c** ≥3 mi; **d**=1Mj; **e** = 1Mj+1mi; **f**=1Mj+2mi; **g** = 2Mj+1mi; **h** = 2Mj+ 2mi **DF**- diagnóstico final: **D**- definido; **P**- provável; **S**- possível; **I**- improvável. (*)- secundário.

9.4 Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle

O uso da *Newcastle Pediatric Mitochondrial Disease Scale* é aconselhado não só em casos de DCRM confirmada por diagnóstico bioquímico ou genético, mas também naqueles em que há uma forte suspeita de DCRM (Phoenix et al., 2006)

Aquela escala de seguimento contempla quatro itens: função existente; envolvimento sistémico específico, avaliação clínica actual e qualidade de vida. Quase todas as incapacidades podem ser graduadas de 0-3: 0 normal, 1- ligeiro, 2- moderado e 3- severo. A escala subdivide-se em três versões específicas para cada faixa etária: 0-24 meses, 2-11 anos e 12-18 anos. Em todos os casos, o neurodesenvolvimento e as capacidades funcionais do doente devem ser comparadas com o normal para a idade. A escala deve ser preenchida pelo menos cada 6 meses nos primeiros 2 anos de vida e cada 6 a 12 meses nas crianças mais velhas.

Tabela 47 - Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle (0 - 24 M).

0-24 meses
✓ Função existente (baseado apenas nas respostas dos pais e/ou curadores): visão, audição, comunicação, alimentação, mobilidade.
✓ Envolvimento sistémico específico: convulsões, encefalopatia, gastrointestinal, endócrino, respiratório, cardiovascular, renal, hepático, hematológico. De acordo com entrevista aos pais, conhecimento clínico da criança e registos clínicos.
✓ Avaliação clínica actual (no dia da consulta): crescimento (peso e estatura), desenvolvimento psicomotor, visão, ptose e movimento ocular, miopatia, piramidal, extrapiramidal, neuropatia.
✓ Questionário com itens sobre qualidade de vida: a preencher pelos pais ou curadores.
Qualidade de vida - a preencher pelos pais (0-24 meses)
➤ Este questionário destina-se a dar-nos a sua opinião acerca da saúde do (a) seu (sua) filho(a) nos últimos tempos. Por favor, responda a todas as questões com um x no quadradinho em frente à frase que lhe parecer mais adequada à resposta que quer dar.
1) Como classificaria a saúde geral do seu(sua) filho(a) nas últimas 4 semanas? Muito má <input type="checkbox"/> Má <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Boa <input type="checkbox"/> Muito boa <input type="checkbox"/>
2) Até que ponto é que os problemas de saúde física do(a) seu(sua) filho(a) limitaram a sua actividade (tal como mover-se/deslocar-se ou brincar) nas últimas 4 semanas? Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>
3) Como classificaria a energia/ vitalidade do(a) seu(sua) filho(a) nas últimas 4 semanas? Nenhuma <input type="checkbox"/> Pouca <input type="checkbox"/> Alguma <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Muita <input type="checkbox"/>
4) Como classificaria as dores/desconforto que o(a) seu(sua) filho(a) teve nas últimas 4 semanas? Muitas <input type="checkbox"/> Bastantes <input type="checkbox"/> Algumas <input type="checkbox"/> Poucas <input type="checkbox"/> Nenhumas <input type="checkbox"/>
5) Como classificaria o comportamento do(a) seu(sua) filho(a) em comparação com as outras crianças da mesma idade, nas últimas 4 semanas? Muito mau/pobre <input type="checkbox"/> Mau <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Bom <input type="checkbox"/> Muito bom <input type="checkbox"/>
6) Como classificaria a capacidade do(a) seu(sua) filho(a) para interagir com outras pessoas (ex: consigo, com os irmãos ou outras crianças da mesma idade) em comparação o de outras crianças da idade dele(a), nas últimas 4 semanas? Muito mau/pobre <input type="checkbox"/> Mau <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Bom <input type="checkbox"/> Muito bom <input type="checkbox"/>
7) Até que ponto é que você (pai/ mãe ou prestador de cuidados) teve problemas emocionais (ex: ansiedade, tristeza) provocados da doença do(a) seu (sua) filho(a), nas últimas 4 semanas? Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nenhum <input type="checkbox"/>
8) Até que ponto é que teve o seu tempo limitado devido à doença do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas? Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>
9) Até que ponto é que as actividades da família foram limitadas ou interrompidas devido à doença do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas? Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>
10) Qual foi o custo financeiro da doença do(a) seu(sua) filho(a), nos últimos 6 meses?

Muito elevado Elevado Moderado Pequeno Nenhum

11) Como classificaria a harmonia da sua família (capacidade/ habilidade da sua família para ir levando a vida), nas últimas 4 semanas?

Muito má Má Razoável Boa Muito boa

12) Com que frequência é que a doença do(a) seu(sua) filho(a) teve um efeito positivo no(a) seu(sua) filho(a), no(a) senhor(a) ou na sua família (ex: ser bem tratada devido à doença, conhecer gente nova), nas últimas 4 semanas?

Nunca Raramente Ocasionalmente Frequentemente Quase sempre

Tabela 48 - Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle (2 - 11 A).

2 aos 11 anos	
✓	Função existente (baseado apenas nas respostas dos pais e/ou curadores): visão, audição, comunicação, alimentação, cuidados pessoais (higiene, vestir, uso de utensílios ex: para comer) mobilidade, rendimento escolar.
✓	Envolvimento sistémico específico: convulsões, encefalopatia, episódios tipo acidente vascular cerebral (AVC), gastrointestinal, endócrino, respiratório, cardiovascular, renal, hepático, hematológico. De acordo com entrevista aos pais/criança, conhecimento clínico da criança e registos clínicos.
✓	Avaliação clínica actual (no dia da consulta): crescimento (peso e estatura), desenvolvimento psicomotor, visão, ptose e movimento ocular, miopatia, ataxia, piramidal, extrapiramidal, neuropatia.
✓	Questionários com itens sobre qualidade de vida: a preencher pelos pais /curadores e pela criança dos 7 aos 11 anos.
Qualidade de vida - a preencher pelos pais (2-11 anos)	
➤ Este questionário destina-se a dar-nos a sua opinião acerca da saúde do (a) seu (sua) filho(a) nos últimos tempos. Por favor, responda a todas as questões com um x no quadrado em frente à frase que lhe parecer mais adequada à resposta que quer dar.	
1) Como classificaria a saúde geral do(a) seu(sua) filho(a) nas últimas 4 semanas?	
Muito má <input type="checkbox"/> Má <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Boa <input type="checkbox"/> Muito boa <input type="checkbox"/>	
2) Até que ponto é que os problemas de saúde física do(a) seu(sua) filho(a) limitaram a sua actividade (tal como caminhar ou brincar com os amigos) nas últimas 4 semanas?	
Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>	
3) Nas últimas 4 semanas até que ponto é que os problemas de saúde do(a) seu(sua) filho(a) limitaram a sua vida diária (tal como frequentar a escola, cuidar de si próprio) comparado com uma criança da mesma idade em perfeita saúde?	
Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>	
4) Quanta energia/ vitalidade teve o(a) seu(sua) filho(a) nas últimas 4 semanas?	
Nenhuma <input type="checkbox"/> Pouca <input type="checkbox"/> Alguma <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Muita <input type="checkbox"/>	
5) Quantas dores/desconforto teve o (a) seu (sua) filho(a) nas últimas 4 semanas?	
Muitas <input type="checkbox"/> Bastantes <input type="checkbox"/> Algumas <input type="checkbox"/> Poucas <input type="checkbox"/> Nenhumas <input type="checkbox"/>	
6) Nas últimas 4 semanas até que ponto é que o(a) seu(sua) filho(a) foi perturbado(a) por problemas emocionais?	
Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>	
7) Nas últimas 4 semanas até que ponto é que o(a) seu(sua) filho(a) se mostrou satisfeito com as suas capacidades, o seu aspecto, a sua relação com as outras pessoas e a vida em geral.	
Muito insatisfeito <input type="checkbox"/> Bastante insatisfeito <input type="checkbox"/> Nem satisfeito nem insatisfeito <input type="checkbox"/> Bastante satisfeito <input type="checkbox"/> Muito satisfeito <input type="checkbox"/>	
8) Como classificaria o comportamento do(a) seu(sua) filho(a) em comparação com as outras crianças da mesma idade, nas últimas 4 semanas?	
Muito mau/pobre <input type="checkbox"/> Mau <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Bom <input type="checkbox"/> Muito bom <input type="checkbox"/>	
9) Como classificaria a capacidade do(a) seu(sua) filho(a) interagir com outras pessoas (ex: fazer amigos, falar com outras	

crianças ou estranhos) em comparação com as outras crianças da mesma idade, nas últimas 4 semanas?

Muito má Má Razoável Boa Muito boa

10) Até que ponto é que você (pai/ mãe ou prestador de cuidados) teve problemas emocionais (ex: ansiedade, tristeza) provocados pela doença do(a) seu (sua) filho(a), nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo Muito Bastante Um pouco Nenhum

11) Até que ponto é que teve o seu tempo limitado devido à doença do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo Muito Bastante Um pouco Nada

12) Até que ponto é que as actividades da família foram limitadas ou interrompidas devido à doença do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo Muito Bastante Um pouco Nada

13) Qual foi o custo financeiro da doença do(a) seu(sua) filho(a), nos últimos 6 meses?

Muito elevado Elevado Moderado Pequeno Nenhum

14) Como classificaria a harmonia da sua família (capacidade/ habilidade da sua família para ir levando a vida), nas últimas 4 semanas?

Muito má Má Razoável Boa Muito boa

15) Com que frequência é que a doença do(a) seu(sua) filho(a) teve um efeito positivo no(a) seu(sua) filho(a), no(a) senhor(a) ou na sua família (ex: ser bem tratada devido à doença, conhecer gente nova), nas últimas 4 semanas?

Nunca Raramente Ocasionalmente Frequentemente Quase sempre

Qualidade de vida – a preencher pelo próprio (7-11 anos)

- Gostaríamos de saber como te tens sentido recentemente. Por favor, responde a todas as perguntas com um x no quadradinho em frente à frase que te parecer mais adequada à resposta que queres dar.

1) Como classificarias o teu estado de saúde geral nas últimas 4 semanas?

Muito mau Mau Razoável Bom Muito bom

2) Até que ponto é que os teus problemas de saúde limitaram a tua actividade física (tal como caminhar ou sair com os teus amigos nas últimas 4 semanas)?

Muitíssimo Muito Bastante Um pouco Nada

3) Até que ponto é que os teus problemas de saúde limitaram a tua vida diária (tal como ir à escola, cuidar de ti próprio), em comparação com uma pessoa da tua idade de perfeita saúde, nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo Muito Bastante Um pouco Nada

4) Como te sentiste nas últimas 4 semanas, em termos de *energia/ vitalidade*?

Nenhuma Pouca Alguma Bastante Muita

5) Tiveste dores ou desconforto nas últimas 4 semanas?

Muitas Bastantes Algumas Poucas Nenhumas

6) Até que ponto é que tiveste problemas emocionais (ex: sentires-te triste ou assustado), nas últimas 4 semanas?

Muitos Bastantes Alguns Poucos Nenhum

7) Nas últimas 4 semanas até que ponto é que te sentiste satisfeito com as tuas capacidades, o teu aspecto, a relação com as

outras pessoas e a vida em geral.

Muito insatisfeito Bastante insatisfeito Nem satisfeito nem insatisfeito Bastante satisfeito Muito satisfeito

8) Como classificarias o teu comportamento, em comparação com as outras pessoas da tua idade, nas últimas 4 semanas?

Muito mau Mau Razoável Bom Muito bom

9) Até que ponto é que achaste fácil conviver com os outros (ex: fazer amigos, falar com amigos ou estranhos) em comparação com as outras pessoas da tua idade, nas últimas 4 semanas?

Muito difícil Difícil Normal Fácil Muito fácil

10) Como classificarias a harmonia da tua família (capacidade/ habilidade da sua família para ir levando a vida), nas últimas 4 semanas?

Muito má Má Razoável Boa Muito boa

11) Com que frequência é que a tua doença teve um efeito positivo em ti ou na sua família (ex: ser bem tratado devido à tua doença, conhecer gente nova), nas últimas 4 semanas?

Nunca Raramente Ocasionalmente Frequentemente Quase sempre

Tabela 49 - Doença Mitocondrial - Escala de Seguimento de Newcastle (12 - 18 A).

12-18 anos
✓ Função existente (baseado apenas nas respostas dos pais e/ou curadores e criança): visão, audição, comunicação, alimentação, cuidados pessoais (higiene, vestir, uso de utensílios ex: para comer) mobilidade, rendimento escolar.
✓ Envolvimento sistémico específico: convulsões, encefalopatia, episódios tipo AVC, gastrointestinal, endócrino, respiratório, cardiovascular, renal, hepático, hematológico. De acordo com entrevista aos pais/criança, conhecimento clínico da criança e registos clínicos.
✓ Avaliação clínica actual (no dia da consulta): crescimento (peso e estatura), desenvolvimento psicomotor, visão, ptose e movimento ocular, miopia, ataxia, piramidal, extrapiramidal, neuropatia.
✓ Questionários com itens sobre qualidade de vida: um a preencher pelos pais /curadores e outro, pela criança.
Qualidade de vida - a preencher pelos pais (12-18 anos)
➤ Este questionário destina-se a dar-nos a sua opinião acerca da saúde do (a) seu (sua) filho(a) nos últimos tempos. Por favor, responda a todas as questões com um x no quadradinho em frente à frase que lhe parecer mais adequada à resposta que quer dar.
1) Como classificaria a saúde geral do(a) seu(sua) filho(a) nas últimas 4 semanas? Muito má <input type="checkbox"/> Má <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Boa <input type="checkbox"/> Muito boa <input type="checkbox"/>
2) Até que ponto é que os problemas de saúde física do(a) seu (sua) filho(a) limitaram a sua actividade (tal como caminhar ou divertir-se com os amigos) nas últimas 4 semanas? Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>
3) Até que ponto é que os problemas de saúde do(a) seu(sua) filho(a) limitaram a sua vida diária (tal como frequentar a escola, cuidar de si próprio) comparado com uma pessoa da mesma idade em perfeita saúde, nas últimas 4 semanas? Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>
4) Como classificaria a energia/ vitalidade do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas? Nenhuma <input type="checkbox"/> Pouca <input type="checkbox"/> Alguma <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Muita <input type="checkbox"/>
5) Como classificaria as dores/desconforto que o(a) seu(sua) filho(a) teve nas últimas 4 semanas? Muitas <input type="checkbox"/> Bastantes <input type="checkbox"/> Algumas <input type="checkbox"/> Poucas <input type="checkbox"/> Nenhumas <input type="checkbox"/>
6) Nas últimas 4 semanas até que ponto é que o(a) seu(sua) filho(a) foi perturbado(a) por problemas emocionais? Muitíssimo <input type="checkbox"/> Muito <input type="checkbox"/> Bastante <input type="checkbox"/> Um pouco <input type="checkbox"/> Nada <input type="checkbox"/>
7) Nas últimas 4 semanas até que ponto é que o(a) seu(sua) filho(a) se mostrou satisfeito(a) com as suas capacidades, o seu aspecto, a sua relação com as outras pessoas e a vida em geral? Muito insatisfeito <input type="checkbox"/> Bastante insatisfeito <input type="checkbox"/> Nem satisfeito nem insatisfeito <input type="checkbox"/> Bastante satisfeito <input type="checkbox"/> Muito satisfeito <input type="checkbox"/>
8) Como classificaria o comportamento do(a) seu (sua) filho(a) em comparação com os outros adolescentes da mesma idade, nas últimas 4 semanas? Muito mau/pobre <input type="checkbox"/> Mau <input type="checkbox"/> Razoável <input type="checkbox"/> Bom <input type="checkbox"/> Muito bom <input type="checkbox"/>
9) Como classificaria a capacidade do seu (sua) filho(a) interagir com outras pessoas (ex: fazer amigos, falar com outras pessoas ou estranhos) em comparação com os outros adolescentes da mesma idade, nas últimas 4 semanas?

Muito má <input type="checkbox"/>	Má <input type="checkbox"/>	Razoável <input type="checkbox"/>	Boa <input type="checkbox"/>	Muito boa <input type="checkbox"/>
-----------------------------------	-----------------------------	-----------------------------------	------------------------------	------------------------------------

10) Até que ponto é que você (pai/ mãe ou prestador de cuidados) teve problemas emocionais (ex: ansiedade, tristeza) provocados pela doença do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo <input type="checkbox"/>	Muito <input type="checkbox"/>	Bastante <input type="checkbox"/>	Um pouco <input type="checkbox"/>	Nenhum <input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	---------------------------------

11) Até que ponto é que teve o seu tempo limitado devido à doença do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo <input type="checkbox"/>	Muito <input type="checkbox"/>	Bastante <input type="checkbox"/>	Um pouco <input type="checkbox"/>	Nada <input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

12) Até que ponto é que as actividades da família foram limitadas ou interrompidas devido à doença do(a) seu(sua) filho(a), nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo <input type="checkbox"/>	Muito <input type="checkbox"/>	Bastante <input type="checkbox"/>	Um pouco <input type="checkbox"/>	Nada <input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

13) Qual foi o custo financeiro da doença do(a) seu(sua) filho(a), nos últimos 6 meses?

Muito elevado <input type="checkbox"/>	Elevado <input type="checkbox"/>	Moderado <input type="checkbox"/>	Pequeno <input type="checkbox"/>	Nenhum <input type="checkbox"/>
--	----------------------------------	-----------------------------------	----------------------------------	---------------------------------

14) Como classificaria a harmonia da sua família (capacidade/ habilidade da sua família para ir levando a vida), nas últimas 4 semanas?

Muito má <input type="checkbox"/>	Má <input type="checkbox"/>	Razoável <input type="checkbox"/>	Boa <input type="checkbox"/>	Muito boa <input type="checkbox"/>
-----------------------------------	-----------------------------	-----------------------------------	------------------------------	------------------------------------

15) Com que frequência é que a doença do(a) seu (sua) filho(a) teve um efeito positivo no(a) seu (sua) filho(a), no(a) senhor(a) ou na sua família (ex: ser bem tratada devido à doença, conhecer gente nova), nas últimas 4 semanas?

Nunca <input type="checkbox"/>	Raramente <input type="checkbox"/>	Ocasionalmente <input type="checkbox"/>	Frequentemente <input type="checkbox"/>	Quase sempre <input type="checkbox"/>
--------------------------------	------------------------------------	---	---	---------------------------------------

Qualidade de vida – a preencher pelo próprio (12-18 anos)

- Gostaríamos de saber como te tens sentido recentemente. Por favor, responde a todas as perguntas com um x no quadradinho em frente à frase que te parecer mais adequada à resposta que queres dar.

1) Como classificarias o teu estado de saúde geral, nas últimas 4 semanas?

Muito mau <input type="checkbox"/>	Mau <input type="checkbox"/>	Razoável <input type="checkbox"/>	Bom <input type="checkbox"/>	Muito bom <input type="checkbox"/>
------------------------------------	------------------------------	-----------------------------------	------------------------------	------------------------------------

2) Até que ponto é que os teus problemas de saúde limitaram a tua actividade física (tal como caminhar ou sair com os teus amigos) nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo <input type="checkbox"/>	Muito <input type="checkbox"/>	Bastante <input type="checkbox"/>	Um pouco <input type="checkbox"/>	Nada <input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

3) Até que ponto é que os teus problemas de saúde limitaram a tua vida diária (tal como ir à escola, cuidar de ti próprio), em comparação com uma pessoa da tua idade de perfeita saúde, nas últimas 4 semanas?

Muitíssimo <input type="checkbox"/>	Muito <input type="checkbox"/>	Bastante <input type="checkbox"/>	Um pouco <input type="checkbox"/>	Nada <input type="checkbox"/>
-------------------------------------	--------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

4) Como te sentiste nas últimas 4 semanas, em termos de *energia*?

Nenhuma <input type="checkbox"/>	Pouca <input type="checkbox"/>	Alguma <input type="checkbox"/>	Bastante <input type="checkbox"/>	Muita <input type="checkbox"/>
----------------------------------	--------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------	--------------------------------

5) Tiveste dores ou desconforto nas últimas 4 semanas?

Muitas <input type="checkbox"/>	Bastantes <input type="checkbox"/>	Algumas <input type="checkbox"/>	Poucas <input type="checkbox"/>	Nenhumas <input type="checkbox"/>
---------------------------------	------------------------------------	----------------------------------	---------------------------------	-----------------------------------

6) Até que ponto é que tiveste problemas emocionais (ex: sentires-te triste ou assustado), nas últimas 4 semanas?

Muitos <input type="checkbox"/>	Bastantes <input type="checkbox"/>	Alguns <input type="checkbox"/>	Poucos <input type="checkbox"/>	Nenhum <input type="checkbox"/>
---------------------------------	------------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

7) Nas últimas 4 semanas até que ponto é que te sentiste satisfeito com as tuas capacidades, o teu aspecto, a relação com as outras pessoas e a vida em geral?

Muito insatisfeito Bastante insatisfeito Nem satisfeito nem insatisfeito Bastante satisfeito Muito satisfeito

8) Como classificarias o teu comportamento, em comparação com as outras pessoas da tua idade, nas últimas 4 semanas?

Muito mau Mau Razoável Bom Muito bom

9) Até que ponto é que achaste fácil conviver com os outros (ex: fazer amigos, falar com amigos ou estranhos) em comparação com as outras pessoas da tua idade, nas últimas 4 semanas?

Muito difícil Difícil Normal Fácil Muito fácil

10) Como classificarias a harmonia da tua família (capacidade/ habilidade da sua família para ir levando a vida), nas últimas 4 semanas?

Muito má Má Razoável Boa Muito boa

11) Com que frequência é que a tua doença teve um efeito positivo em ti ou na sua família (ex: ser bem tratado devido à tua doença, conhecer gente nova), nas últimas 4 semanas?

Nunca Raramente Ocasionalmente Frequentemente Quase sempre

9.5 Doença mitocondrial na Região Centro de Portugal -publicação



Pediatric Mitochondrial Respiratory Chain Disorders in the Centro Region of Portugal

Luísa Diogo, MD^{*†‡}, Manuela Grazina, PhD^{†‡}, Paula Garcia, MD^{*}, Olinda Rebelo, MD[§], Margarida Alte Veiga, BSc^{||}, Juan Cuevas, MD, PhD^{||}, Laura Vilarinho, PhD[#], Isabel Tavares de Almeida, PhD^{**}, and Catarina Resende Oliveira, MD, PhD^{†‡}

The present study reviewed mitochondrial respiratory chain disorders diagnosed at the sole tertiary pediatric hospital in the Centro region of Portugal and estimated incidence and prevalence in this region. The Bernier criteria were used to retrospectively classify 200 children investigated from 1997 to 2006. A total of 78 patients were assigned with definite primary mitochondrial disorder, two thirds presenting in the first year of life. At presentation, 61 children had neuromuscular symptoms. Neurologic, ophthalmologic, growth retardation, muscular, cardiac, respiratory, hepatic, hematologic, and digestive symptoms were the most frequent clinical features. A classic mitochondrial syndrome was identified in 12 children, 6 of them with Leigh syndrome. Major respiratory chain enzymatic defects were detected in 73 cases. Pathogenic mitochondrial DNA or nuclear DNA mutations (or both) were observed in 9 children. Mortality was 29.5%, with median age of death at 8 months. Survival was shorter for patients with onset at infancy or children with liver or cardiac involvement, or with lactic acidosis. Estimated incidence of mitochondrial disorders in children less than 10-years-old was 1.5/10,000, and point prevalence was 5.4/100,000, respectively. These disorders seem to have a high incidence and poor prognosis in the Centro region of Portugal. © 2009 by Elsevier Inc. All rights reserved.

Diogo L, Grazina M, Garcia P, Rebelo O, Veiga MA, Cuevas J, Vilarinho L, de Almeida IT, Oliveira CR. Pediatric

mitochondrial respiratory chain disorders in the Centro region of Portugal. *Pediatr Neurol* 2009;40:351-356.

Introduction

Mitochondrial respiratory chain (MRC) disorders, defined as primary diseases of the oxidative phosphorylation system, are a protean group of metabolic disorders, difficult to diagnose and classify, given that there are no universally accepted diagnostic criteria. Several diagnostic systems have been proposed in recent years, mostly based on the original criteria of Walker et al. [1], which were designed for adult patients. Clinical, neuroradiologic, biochemical, histologic, enzymatic, and genetic criteria are used in various combinations in all diagnostic schemes [1-5].

The objective of the present study was to evaluate the main clinical features at presentation and during evolution in a population of children with diagnosis of definite MRC disorder, based on the criteria of Bernier et al. [2], and to estimate the incidence and prevalence of MRC disorder in children under 10 years of age in the Centro region of Portugal.

Materials and Methods

The Pediatric Hospital of Coimbra (Hospital Pediátrico de Coimbra) serves as the tertiary level pediatric unit for the Centro region of Portugal. This region has more than 2 million inhabitants, of whom approximately 10% are under the age of 10 years: 226,708 out of 2,348,397 according to the 2001 census [6].

From the ^{*}Metabolic Diseases Unit, Center for Child Development "Luís Borges," Pediatric Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal; [†]Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; [‡]Centro for Neuroscience and Cellular Biology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal; [§]Laboratory of Neuropathology, University Hospital of Coimbra, Coimbra, Portugal; ^{||}Statistics Division, Portuguese League Against Cancer, Coimbra, Portugal; [#]Anatomic Pathology Service, University Hospital, Santiago de Compostela, Spain; [^]National Screening Laboratory, Institute of Medical Genetics "Jacinto de Magalhães," Porto, Portugal; and ^{**}Center for Molecular Pathogenesis, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon, Portugal.

Communications should be addressed to:
Dr. Diogo; Unidade de Doenças Metabólicas, Centro de Desenvolvimento da Criança Luís Borges, Hospital Pediátrico de Coimbra, Av. Bissaya Barreto, 3000 Coimbra, Portugal.
E-mail: diogo.luisa@gmail.com
Received August 11, 2008; accepted November 14, 2008.

In the 10 years from 1997 to 2006, 200 children (105 boys and 95 girls) had one or more analyses done because of clinical suspicion of MRC disorders involving muscle (193 patients), liver (41), and myocardium (11).

Although investigation was individually tailored, an assessment of cardiac, liver, renal, and bone marrow function was done in every patient. Plasma lactate, pyruvate, and amino acids determination were included as part of the biochemical tests performed, along with a urinary organic acids profile evaluation. In selected cases (94 patients), cerebrospinal spinal fluid lactate measurement was also performed. Lactate, pyruvate, amino acids, and organic acids were evaluated by standard methods. Elevated plasma or cerebrospinal spinal fluid lactate was defined as lactate concentration greater than 2.1 mmol/L at any age. A lactate/pyruvate ratio greater than 20 was considered to be elevated. Lactic acidosis was defined as plasma bicarbonate level lower than 15 mmol/L and plasma lactate level higher than 5 mmol/L.

Neuroimaging evaluations (one or more, using magnetic resonance imaging, computed tomography, or cerebral ultrasound) were done in 179 children. Magnetic resonance spectroscopy was performed in 33 of the 149 patients who had magnetic resonance imaging scans; lactate peaks were revealed in 8 of the 33.

Post mortem tissue collection was done in the first 3 hours after death in select cases.

Standard pathologic evaluation of the tissue samples (including Gomori's trichrome staining and conventional histochemical techniques in muscle) was done in 193 patients and muscle electron microscopy in 89 patients.

Analyses of enzymatic activity of mitochondrial respiratory chain complexes I-V and genetic mtDNA analysis were performed as previously described [7]. The MRC enzymatic activities were measured by double-wavelength spectrophotometry, according to the method of Rustin et al. [8]. The MRC defects were classified as generalized when affecting complex II and at least two other complexes, and as multiple if involving more than two complexes, except complex II.

Genetic analysis of mtDNA, including point mutations (1555A>G; 3243A>G; 3256C>T; 3260A>G; 3271T>C; 3302A>G; 3460G>A; 4216T>C; 4917A>G; 7445A>G; 8344A>G; 8356T>C; 8993T>C/G; 9176T>C; 11778G>A; 13708G>A; 14484T>C) and large deletions, made in all cases, was performed by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism, allele-specific polymerase chain reaction for point mutations, and long polymerase chain reaction for deletions. Positive findings were confirmed by direct automatic sequencing.

Direct sequencing of the coding exons of the *SURF1* and deoxyguanosine kinase (*DGUOK*) genes was performed in selected cases.

Patients were classified according to the Bemier criteria for MRC disorders in children [2]. A definite diagnosis was considered if two major or one major plus two minor criteria were fulfilled. Presence of one major plus one minor or three or more minor criteria defined a probable MRC disorder. One major or two minor criteria defined a possible MRC disorder. For these diagnostic groups, the presence of both clinical and laboratorial criteria was obligatory. The remaining patients were considered as unlikely, all fulfilling minor clinical but no laboratory criteria.

Multisystemic disease was defined as primary involvement of three or more organs or systems. A mild or severe MRC defect (less than 30% or 20% of normal mean, expressed as a ratio to citrate synthase) were used as minor and major enzymatic criteria, respectively [2].

In the present study, only children with primary definite MRC disorders cases were included.

Statistical analysis was performed using SPSS software [9]. Survival analysis was done by the Kaplan–Meier method and log-rank test. The following were evaluated as survival factors: onset of disease in the first six months of life, liver involvement (as one or more of acute liver failure, liver enlargement, cholestasis, liver cytolysis, and hypoprothrombinemia), cardiac involvement (as one or more of cardiomyopathy, cardiac failure, and arrhythmia), hyperlactacidemia, and hyperalaninemia.

For the calculation of incidence and prevalence, 16 of the 78 patients were excluded because they were born outside the region under study; thus, 62 patients were included for the epidemiological calculations. Incidence was estimated as the ratio between the number of affected children

and that of newborns in the Centro region of Portugal in an 8-year interval, 1989–1996 [10]. This interval was chosen so that the youngest patient would have reached 10 years of age by the end of the study. Point prevalence was calculated as the ratio between the number of patients under 10 years of age, who were alive at the end of the study, and the number of children in the population, age matched [11]. In all cases, 95% confidence intervals were calculated.

This study was approved by the Ethical Council of Hospital Pediátrico de Coimbra. Informed consent was obtained in all cases.

Results

Among the 200 patients investigated for MRC disorder, another diagnosis was established in 36 cases, and 17 of these fulfilled criteria for definite MRC disorder but were classified as secondary MRC disorders. Only the patients diagnosed with primary definite MRC disorder ($n = 78$) are the subject of this review.

Two different diagnostic circumstances occurred in this group of 78 patients: programmed biopsies in chronic patients ($n = 56$) and emergency biopsy or immediate post mortem tissue collection in children with acute episodes of illness, either with ($n = 10$) or without ($n = 12$) previous chronic disease. In seven cases, only post mortem tissue was available for testing.

Clinical manifestations

The male:female ratio in the group of 78 children with primary definite MRC disorders was 1.1. The age at onset of clinical signs varied from the first day after birth to 8 years of age (median four months). One third of the patients presented in the neonatal period, and two thirds in the first year.

Patients came from 77 nonrelated families. Sudden death was reported in previous members of 20 families, affecting newborns in 10 cases and infants in 4 cases.

One third of the pregnancies and two thirds of the deliveries were abnormal. Premature delivery occurred in 10 cases, and 11 newborns had low Apgar score index (less than 4 and 8 at the first and the fifth minutes of life, respectively). Twenty-three neonates received special medical care after birth, with long-term hospitalization.

Prenatal manifestations were observed in 16 children, the most frequent being intrauterine growth retardation ($n = 10$) and congenital cardiomyopathy ($n = 3$).

Of the 78 patients, 61 presented with neurological symptoms, muscle symptoms, or both. Among these, psychomotor development delay or regression (either or both) and hypotonia were the most frequent (Table 1). Growth failure and cardiopathy were the most frequent manifestations reported at onset in the remaining 17 children (Table 1).

Neurologic involvement, ophthalmologic symptoms, and growth retardation were the main clinical features observed upon evolution (Table 2). Nineteen children developed multisystemic disease. The main neurological manifestations detected were development delay or regression ($n = 56$), hypotonia ($n = 41$), and epilepsy ($n = 29$). The most frequent

Table 1. Neuromuscular and extraneuromuscular symptoms at onset in 78 patients with definite MRC disorders

Symptom	Cases, no.
Neuromuscular symptoms at onset (<i>n</i> = 61)	
Developmental delay or regression	32
Hypotonia	23
Seizures	15
Myopathy	12
Strabismus	5
Apnea	3
Coma	3
Pyramidal syndrome	3
Sucking or swallowing dysfunction	2
Dystonia	1
Microcephaly	1
Tremor	1
Extra neuromuscular symptoms at onset (<i>n</i> = 17)	
Growth failure	7
Cardiopathy	4
Vomiting	3
Symptomatic lactic acidosis	3
Liver disease	3
Visual dysfunction	2
Chronic diarrhea	2

Abbreviation:
MRC = Mitochondrial respiratory chain

ophthalmologic features were strabismus (*n* = 9), ophthalmoplegia (*n* = 8), palpebral ptosis (*n* = 7), retinopathy (*n* = 5), and optic atrophy (*n* = 4).

Of the 78 patients, 21 had both low weight and short stature, 5 were of low weight for age, and 3 had isolated short stature.

A classical mitochondrial syndrome was identified in 12 children: six with Leigh syndrome and one each with Leber hereditary optic neuropathy, Pearson syndrome, mtDNA

Table 2. Clinical manifestations in 78 patients with definite MRC disorders at the time of diagnostic studies

Clinical Manifestations	Cases, no.
Neurologic	71
Ophthalmologic	30
Growth retardation	29
Muscular	16
Cardiac	15
Respiratory	13
Liver	11
Hematologic	9
Digestive	8
Bone	7
Deafness	5
Skin	4
Renal	4
Hypogonadism	1

Abbreviation:
MRC = Mitochondrial respiratory chain

depletion syndrome, Kearns-Sayre syndrome, lethal infantile encephalopathy, and mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis (MELAS syndrome).

Investigation

Hyperlactacidemia in one or more determinations was detected in 64 of the 78 patients. Lactic acidosis was identified in 8 children, and the lactate/pyruvate ratio was elevated in 38 of the 45 children investigated for this parameter. Plasma amino acids profiles revealed abnormal alanine concentration in 21 of 69 children. In all cases, increased alanine levels were associated with hyperlactacidemia. Urinary organic acids profiles were abnormal in 16 of the 78 patients; increased levels of lactate or Krebs cycle intermediates (or both) were detected in 12 cases, and abnormal dicarboxylic aciduria was found in 6 cases. Cerebrospinal spinal fluid lactate was measured in 36 children and was found to be elevated in 12 of them.

Abnormal neuroimaging findings were present in 47 of 69 children; most frequently observed were volume loss (*n* = 41), supratentorial white matter (*n* = 14), and basal ganglia lesions (*n* = 9). Proton magnetic resonance spectroscopy analysis revealed abnormal lactate peaks in 7 of 16 cases. All except one of the seven children with lactate peaks in spectroscopy had abnormal findings with magnetic resonance imaging.

Optic microscopy revealed abnormalities in muscle (25 of 75 cases), heart (2 of 3), and liver (13 of 16). The muscle abnormalities observed were increased fiber diameter variability (*n* = 16), type I fiber predominance (*n* = 8), increased oxidative activity (*n* = 5), one with subsarcolemmal cresscents, lipid storage (*n* = 7), ragged red fibers (*n* = 2), neurogenic atrophy (*n* = 2), glycogen storage (*n* = 1), and others (*n* = 3). The heart abnormalities were cytoplasm vacuolization. The liver abnormalities were steatosis (*n* = 4), fibrosis (*n* = 5), cirrhosis (*n* = 3), cholestasis (*n* = 4), hepatitis (*n* = 4), necrosis (*n* = 2), glycogen storage (*n* = 1), and other (*n* = 2). Electron microscopic examination of muscle revealed mitochondrial abnormalities in 4 of 50 children, as vacuolization (*n* = 3) and proliferation with abnormal cristae (*n* = 1).

Enzyme activity of mitochondrial respiratory chain complexes I-V was analyzed in 77 of the 78 patients. Muscle tissue samples were obtained from 74 patients (isolated mitochondria were analyzed in 46 children and muscle homogenate in 53), liver samples were investigated in 17 and myocardium, in five cases. A MRC deficiency was found in at least one tissue sample in 73 patients; the deficiency was severe (less than 20% of normal mean) in 72 of them (Table 3). Complex IV and I deficiencies, isolated (21 and 13 cases, respectively) or in combination (25 and 26 patients, respectively) were the most frequently encountered major enzymatic criteria. In five patients, MRC enzymatic activity was normal in all tissues investigated.

Pathogenic mtDNA or nuclear DNA alterations were observed in nine patients. The mtDNA abnormalities included three point mutations: a 8993T>G mutation in one boy with

Table 3. Frequency of MRC enzyme complex major defects in 72 patients with MRC disorder

MRC Enzyme Complex Involved	Cases, no.
IV	21
I	13
I + IV	11
Multiple*	9
I + V	5
V	4
Generalized†	3
III + IV	3
III	2
II + IV	1

The 72 patients here had MRC enzymatic activity of <20% of normal mean in one or more of muscle, liver, or myocardium (a major diagnostic criterion, according to Bemier et al. [2]).

* Multiple defects: involves more than two complexes, except complex II.

† Generalized deficiency: involves complex II and at least two others.

Abbreviation:

MRC = Mitochondrial respiratory chain

maternally inherited Leigh syndrome, a 3302A>G mutation in a girl with myopathy with ragged red fibers and cardiomyopathy, and a 11778G>A mutation in a girl with atypical Leber hereditary optic neuropathy [7]. The patient with Keams-Sayre syndrome presented the 4977-bp common mutation. A 4404-bp deletion was detected in the child with Pearson syndrome. Mutations in exons 3 (p.R118H) and 6 (p.L250S) of the *DGUOK* gene were found in the one case with mtDNA depletion. Pathogenic mutations in the *SURF1* gene were identified in three patients with Leigh syndrome and complex IV deficiency: a Q8L mutation in exon 1, an insertion and a deletion.

Evolution

At the end of the study, 23 of the 78 studied patients had died. The median age of death was 8 months (range, 1 day to 12 years). Median age of the 55 surviving children at the end of the study was 11 years and 7 months (range, 1 year 7 months to 28 years).

Patients with onset of disease before the age of 6 months and those with liver disease had a shorter survival, as demonstrated by the log-rank test (Fig 1). Cardiac involvement or lactic acidosis were also associated with higher mortality ($P = 0.007$ and $P < 0.001$, respectively).

Incidence and Prevalence

In the period 1989-1996, a recorded total of 188,209 children were born in the Centro region of Portugal [10]. The incidence of MRC disorders in children under 10-years of age, based on 29 patients born in the Centro region in the same time period, was 1.5/10,000 (95% confidence interval = 0.98-2.1).

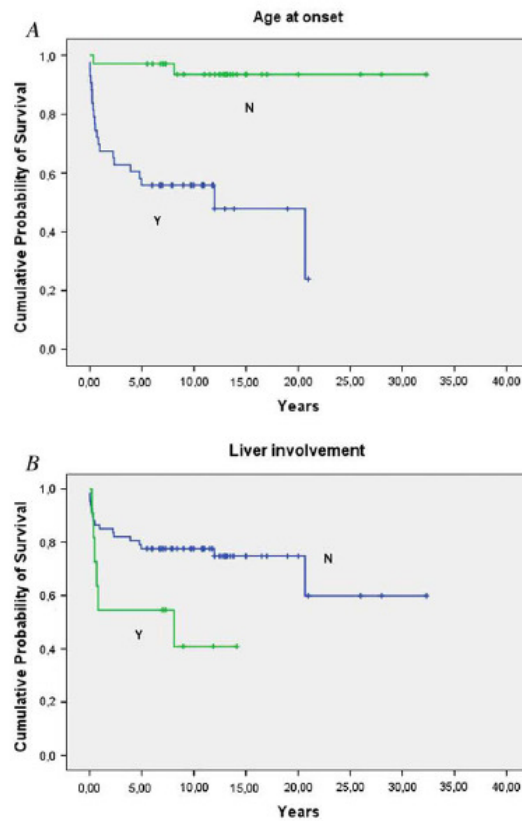


Figure 1. Patients were divided into two groups, according to (A) the age at the first symptoms, before or after six months of life, and (B) the presence or absence of liver manifestations: one or more of acute hepatic insufficiency, liver enlargement, cholestasis, liver cytolysis, and hypoprothrombinemia. Groups were analyzed by the log-rank test. For group A, $P = 0.000$; for group B, $P = 0.027$. Abbreviations: Y = yes; N = no.

At the end of the same period (i.e., 2006), there were 222,342 children younger than 10 years of age living in the region under study [11]. The calculated point prevalence of MRC disorders in the pediatric population of the same age range, in 2006, based on 12 surviving patients, was 5.4/100,000 (95% confidence intervals = 2.3-8.5).

Discussion

It may be assumed that virtually all patients less than 10 years of age suspected of MRC disorders in the Centro region of Portugal were seen at the study hospital, because it is the only tertiary level pediatric unit in the region.

Assessment of epidemiologic approaches to MRC disorders, which are generally based on retrospective data and with variable patient selection and diagnostic criteria, is a difficult task. The Bemier criteria were adopted because of their recognized value and widespread use [2].

The present findings indicate a high incidence of MRC disorders before 10 years of age (1:6490), compared with other pediatric series. Several epidemiological reviews point to an

incidence of MRC disorders between 1:2000 and 1:5000 live births [3,4]. The minimum birth prevalence of MRC disorders was calculated in the Australian population, both in children under 9-12 years of age (1:16,129) and in the general population (1:7634) [12]. Data differ for other populations, depending on patient selection, diagnostic criteria, and type of study; most studies have been retrospective [13-17].

In western Sweden, the incidence of mitochondrial encephalomyopathies in subjects less than 16 years of age was calculated to be 1:21,227, and that of pre-school ages, 1:11,000 [18]. In northwest Spain, an annual incidence of 1:69,930 for children younger than 16 years and 1:35,088 for children younger than 6 years was based on the experience of a neuropediatric department [13]. Although almost all MRC disorders children in the present cohort had central nervous system involvement upon evolution, patient selection was based on the suspicion of MRC disorders of any type. Other criteria were used in other studies of MRC disorders. Nonetheless, the estimated incidence in the present series is much higher than that among Australian children, which did use the same diagnostic criteria [12].

Children in this cohort were in general severely affected, with a high mortality rate. A significant proportion of patients were critically ill at the time of the tissue collection. This may account for the high percentage of cases diagnosed with definite primary MRC disorders in the present series (39%), compared with data from other studies: 23% reported by Munnich et al. [19] and 28% reported by Scaglia et al. [20]. It can be hypothesized that some acutely ill patients could have died without a diagnosis under a more selective investigation protocol.

The diagnosis of MRC disorders in the present series was highly dependent on detection of a decrease of MRC enzyme complex activity, which was identified in most patients. Pathogenic mtDNA and nuclear DNA abnormalities were found in few patients, unlike the findings from other series [12,18,20,21]. Considering the mtDNA mutation screening used, a higher number of mtDNA positive cases could be expected. In another study, mitochondrial tRNA point mutations and deletions were present in 18% of children with MRC deficiencies [21]; however, the criterion to define a MRC deficiency (enzymatic activity value less than 90% of the lowest reference value) differs from that of the present study. On the other hand, the regions of mtDNA screened are also diverse, which may contribute to differences in the number of mutants identified.

The low number of nuclear DNA mutations detected in the present sample may be explained by the fact that only *SURF1* mutations and mtDNA copy number were investigated in selected cases. Abnormalities in the *SURF1* gene were found in half of the Leigh Syndrome patients of this series, and all except one had complex IV deficiency. In these cases, a higher correlation has been demonstrated between genetic and MRC biochemical data.

The apparently uncommonly high percentage of MRC enzymatic activity-deficient cases found in the present series is worthy of particular attention. It is well known that

MRC enzymatic activity abnormalities are not specific, because they are also found in other disorders [22]. The contribution of MRC enzymatic defects resulting from secondary causes in the present series is difficult to ascertain. The detailed etiological investigation in the initial 200 patients revealed other diagnoses in 36 cases, 17 of which fulfilled the criteria of definite MRC disorders. Among these, a viral infection (in 6 children) and other inherited metabolic disorders (in 4 children) were the most frequent. Overlooked secondary MRC deficiencies could therefore contribute to the higher estimated incidence of MRC disorders in the present population.

The diagnostic significance of MRC biochemical data is hard to establish and is highly dependent on the definition of MRC enzyme complex defects. There is heterogeneity in the presentation and analysis of the results of MRC enzyme complex activity determination [5,22-24].

In patients with MRC disorders, considerable residual MRC enzymatic activities are common, and normal values are occasionally found in the tissues investigated. Furthermore, normal isolated MRC enzyme complex activities may be associated with abnormal activity ratios, which have been shown to be deleterious [23]. These facts are crucial to the diverse sensitivity and specificity of the different approaches to diagnosis of MRC disorders.

Considering MRC evaluation in the present set of patients, defects involved mostly complexes IV and I. These results are consistent with current literature, which indicates complexes I and IV as most frequently involved in childhood MRC disorders [13,20]. However, contrary to the majority of the published studies, complex IV deficiency was predominant in the present sample (70%), as in northwest Spain (63%) [13]. Although a correlation with morphological alterations in mitochondria carrying these defects could be expected, we did not find any case with cyclooxygenase-negative muscle fibers.

The morphological characterization of mitochondrial abnormalities, although not specific, is another important laboratory tool that contributes to the criteria considered for diagnosis [25]. Structural mitochondrial abnormalities were identified in few of the patients in the present cohort. This low figure could be explained by the young age of the patients and the proportion of patients with acute disease, because mitochondrial morphological abnormalities take time to develop [13,15,17]. Furthermore, because there are no generally accepted definitions for abnormal morphological mitochondria, perhaps the present criteria were very stringent.

Clinical manifestations of MRC disorders are variable in terms of age of onset, affected organs, and clinical severity, and especially so in children [19]. The present series fully illustrates the protean character of the clinical manifestations of MRC disorders. The majority of symptoms are non-specific, and only their association over time suggests the diagnosis. As expected, neurological symptoms, either at presentation or during evolution, were predominant, particularly development delay or regression and epilepsy.

Mitochondrial respiratory chain disorders were found in 5 of 11 autistic patients with confirmed hyperlactacidemia, as part of a population-based study of autism spectrum disorders [26].

Corroborating the report of Scaglia et al. [20], patients with cardiac disease had a more severe outcome. Liver involvement was also a bad prognosis factor in the present cohort. As observed by others [14], a negative correlation between onset in the first 3 months of life and survival was identified.

Conclusions

Presented here is a retrospective analysis of pediatric patients suspected of MRC disorders and observed in a tertiary pediatric unit over a decade, in what is, to our knowledge, the first epidemiological review of MRC disorders in Portuguese children. Childhood MRC disorders have a high incidence and a severe prognosis in the Centro region of Portugal. It is difficult to compare the present data with findings from other series, because of differences in patient selection and diagnostic approaches. Consensus on diagnostic criteria, disease definition, and classification of MRC disorders are essential to accurately defining their prevalence and natural history, toward improved planning health and social services to support patients and their families [3].

Thanks go to Professor H. Carmona da Mota, PhD (Hospital Pediátrico de Coimbra), for critical review of the manuscript.

References

- [1] Walker UA, Collins S, Byrne E. Respiratory chain encephalomyopathies: a diagnostic classification. *Eur Neurol* 1996;36:260-7.
- [2] Bernier FP, Boneh A, Dennett X, Chow CW, Cleary MA, Thorburn DR. Diagnostic criteria for respiratory chain disorders in adults and children. *Neurology* 2002;59:1406-11.
- [3] Naviaux RK. Developing a systematic approach to the diagnosis and classification of mitochondrial disease. *Mitochondrion* 2004;4:351-61.
- [4] Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2004;1659:115-20.
- [5] Wolf NI, Smeitink JA. Mitochondrial disorders: a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology* 2002;59:1402-5.
- [6] National Institute of Statistics. Census 2001: provisional results: XIV general census of the population [In Portuguese]. Lisbon: INE, 2002.
- [7] Grazina MM, Diogo LM, Garcia PC, et al. Atypical presentation of Leber's hereditary optic neuropathy associated to mtDNA 11778G>A point mutation: a case report. *Eur J Paediatr Neurol* 2007;11:115-8.
- [8] Rustin P, Chrétien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228:35-51.
- [9] Einstein G, Abemethy K. Statistical Package for the Social Sciences: SPSS 10.0 Applications guide. Chicago: SPSS, 1999.
- [10] Osório RV. Results and Conclusions. National Program for Early Diagnosis: Report of activities 1989:38, 1990:39, 1991:45, 1992:23, 1993:61, 1994:53, 1995:49, 1996:50 [In Portuguese]. Porto, Portugal: Institute of Medical Genetics "Jacinto de Magalhães."
- [11] National Institute of Statistics. Provisional population estimates of the resident population: Portugal, NUTS II, NUTS III, and municipalities in 2006 [In Portuguese]. Lisbon: INE, 2007.
- [12] Thorburn DR. Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *J Inher Metab Dis* 2004;27:349-62.
- [13] Castro-Gago M, Blanco-Barca MO, Campos-González Y, Arenas-Barbero J, Pintos-Martínez E, Eiris-Puñal J. Epidemiology of pediatric mitochondrial respiratory chain disorders in northwest Spain. *Pediatr Neurol* 2006;34:204-11.
- [14] Debray FG, Lambert M, Chevalier I, et al. Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases. *Pediatrics* 2007;119:722-33.
- [15] Miles L, Wong BL, Dinopoulos A, Morehart PJ, Hofmann IA, Bove KE. Investigation of children for mitochondrial disorders: clinical, morphological and molecular genetic evaluation. *J Neurol* 2001;248: 778-88.
- [16] Sciacco M, Prella A, Comi GP, et al. Retrospective study of a large population of patients affected with mitochondrial disorders: clinical, morphological and molecular genetic evaluation. *J Neurol* 2001;248: 778-88.
- [17] Uusimaa J, Remes AM, Rantala H, et al. Childhood encephalopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics* 2000;105: 598-603.
- [18] Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 2001;49:377-83.
- [19] Munnich A, Rötig A, Chretien D, et al. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inher Metab Dis* 1996;19:521-7.
- [20] Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, et al. Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 2004;114:925-31.
- [21] Uusimaa J, Finnilä S, Remes AM, et al. Molecular epidemiology of childhood mitochondrial encephalomyopathies in a Finnish population: sequence analysis of entire mtDNA of 17 children reveals heteroplasmic mutations in tRNA^{Arg}, tRNA^{Glu}, and tRNA^{Leu(UUR)} genes. *Pediatrics* 2004;114:443-50.
- [22] Hui J, Kirby DM, Thorburn DR, Boneh A. Decreased activities of mitochondrial respiratory chain complexes in non-mitochondrial respiratory chain diseases. *Dev Med Child Neurol* 2006;48:132-6.
- [23] Geromel V, Parfait B, von Kleist-Retzow JC, et al. The consequences of a mild respiratory chain deficiency on substrate competitive oxidation in human mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236:643-6.
- [24] Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, et al. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol* 2006;63:1122-6.
- [25] Patterson K. Mitochondrial muscle pathology. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7:629-32.
- [26] Oliveira G, Diogo L, Grazina M, et al. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a population-based study. *Dev Med Child Neurol* 2005;47:185-9.