Mafalda Rita Avó Bacalhau

Avaliação Experimental da Patogenicidade de Novas Variações de Sequência no Genoma Mitocondrial

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Mestrado em Investigação Biomédica, Ramo de Neurobiologia

2012

· U C ·

Universidade de Coimbra

· U C ·

Faculdade de Medicina

Universidade de Coimbra

Análise Experimental da patogenicidade de variações de sequência novas no genoma mitocondrial

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Investigação Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Grazina (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra)

Mafalda Bacalhau, 2012

Copyright© Mafalda Bacalhau e Manuela Grazina, 2012.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e do orientador científico e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada e autorização.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and scientific supervisor and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment and authorization.

Agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem a colaboração, empenho e incentivo de várias pessoas. Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta etapa se tenha tornado realidade.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Manuela Grazina, minha orientadora, por ter aceite a orientação do meu trabalho. Ainda na licenciatura, a breve estadia no seu laboratório foi suficiente para que a quisesse repetir, desta vez para a realização do trabalho laboratorial referente ao grau de Mestre. Obrigada por ouvir as minhas opiniões e incertezas e por todos os conhecimentos que me transmitiu, que me fizeram crescer a nível pessoal e científico. Agradeço ainda toda a confiança que depositou em mim e a motivação que sempre me transmitiu.

Aos coordenadores do mestrado, Doutor Paulo Pereira e Doutor Henrique Girão, pela ajuda, boa disposição e por tudo o que me ensinaram.

À Professora Doutora Luísa Diogo, aos doentes e seus familiares sem os quais o estudo não teria sido realizado.

Ao Dr. João Pratas por tudo o que me ensinou, por toda a ajuda e paciência que teve para comigo.

À Mestre Maria João Santos por estar disponível sempre que eu precisei e por todo o apoio.

À Dra. Marta Simões, à Mestre Cândida Mendes e à Dra. Mónica Vaz por tudo o que me ensinaram e pela total disponibilidade para me auxiliarem a qualquer momento.

À Mestre Carolina Ribeiro gostaria de fazer um agradecimento especial pelo apoio que foi para mim durante este ano de trabalho intensivo. Obrigada por toda a tua disponibilidade, amizade e companheirismo!

A todos os colaboradores do LBG, obrigada pelos momentos de boa disposição e pela amizade e preocupação!

À Professora Doutora Cristina Rego pelo acolhimento no seu laboratório para a realização de uma tarefa da tese. Obrigada por aceitar prontamente esta colaboração.

À Doutora Teresa Oliveira e ao Dr. Márcio Ribeiro pela disponibilidade total e ajuda.

A todos os meus amigos e colegas que fizeram deste tempo de trabalho, também um tempo de diversão sustentado pela vossa amizade.

À minha família, ao meu irmão e em especial aos meus pais pela educação que me deram e por me terem proporcionado uma excelente formação académica. Todos os meus objetivos alcançados devo-os a vocês.

Ao João pelo apoio incondicional, incentivo, compreensão e paciência em todos os momentos.

A todos vocês, muito obrigada por tudo!

Índice

Listagem de Figuras viii
Listagem de Tabelas ix
Abreviaturas x
Resumo xiv
Abstract xvi

1. Introdução 1
1.1. A Mitocôndria 3
1.1.1. Estrutura e Função 3
1.1.2. Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação oxidativa 4
1.1.3. Genoma Mitocondrial 7
1.2. Citopatias Mitocondriais 11
1.2.1 Alterações genéticas como causa de citopatias mitocondriais 12
1.2.2 Critérios de Patogenicidade de alterações no DNA mitocondrial 14
2. Objetivos 21
3. Metodologia 25
3.1. Amostras Biológicas 27
3.2. Métodos 29
3.2.1. Extração de DNA 29
3.2.2. Quantificação de DNA 30
3.2.3. Reação da polimerase em Cadeia (PCR) 30
3.2.4. Eletroforese em gel de agarose 31
3.2.5. Purificação dos produtos da PCR de amplificação 32
3.2.6. PCR de sequenciação 32
3.2.7. Purificação dos Produtos da PCR de sequenciação 32
3.2.8. Sequenciação automática de DNA 33
3.2.9. Análise de sequências 33
3.2.10. Análise de Restrição enzimática 33
3.2.11. Densitometria de bandas 34
3.2.12. Comparação de fragmentos de mtDNA com pseudogenes nucleares – Análise *in silico* 34
3.2.13. Cultura primária de fibroblastos 35
3.2.14. Extração de RNA 36
3.2.15. Quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA 37
3.2.16. Reação de Transcrição reversa 37
3.2.17. PCR em tempo real 38
3.2.18. Análise de proteínas por *Western-Blotting* 39

3.2.19. Análise da atividade dos complexos da CRM por espectrofotometria 41
3.2.20. Análise Estatística 42
4. Resultados 45
4.1. Estudo genético de alterações no mtDNA em controlos 47
4.2. Determinação do grau de heteroplasmia 48
4.3. Comparação de fragmentos do mtDNA com pseudogenes nucleares 51
4.4. Estudos em fibroblastos em cultura 52
4.4.1.Confirmação da presença das alterações no mtDNA em estudo 52
4.4.2.Confirmação da presença das alterações em estudo no mRNA 53
4.4.3.Análise da atividade dos complexos da CRM 55
4.4.4.Análise dos níveis de transcritos 57
4.4.5.Quantificação relativa das proteínas Cit B e ND4 59
5. Discussão 61
5.1. Estudo genético de alterações no mtDNA 63
5.2. Estudos em fibroblastos em cultura 66
6. Conclusão 75
7. Referências Bibliográficas 79

Listagem de Figuras

Figura 1 – A mitocôndria e vias metabólicas. 3
Figura 2 – Cadeia Respiratória mitocondrial e Fosforilação Oxidativa 6
Figura 3 – Genoma Mitocondrial Humano 8
Figura 4 – Segregação mitótica e heteroplasmia. 9
Figura 5 – Causas de mutações que provocam disfunção na CRM 10
Figura 6 – Síntese de proteínas mitocondriais. 13
Figura 7 – Aspeto morfológico de fibroblastos humanos em cultura, derivados de biópsia de pele, com a confluência adequada 36
Figura 8 – Eletroferogramas relativos à deteção da alteração m.7496T>C 47
Figura 9 – Eletroferogramas relativos à deteção da alteração m.15246G>A 48
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose a 1 49
Figura 11 – Resultados da análise de restrição por PCR-RFLP.. 50
Figura 12 – Eletroferogramas relativos da alteração m.11778G>A. 52
Figura 13 – Eletroferogramas relativos à deteção da alteração m.14771C>A. 53
Figura 14 – Análise da integridade do RNA. 54
Figura 15 – Eletroferogramas relativos às alterações m.11778G>A e m.14771C>A, no cDNA 55
Figura 16 – Atividade enzimática dos complexos da CRM, no doente 12 56
Figura 17 – Níveis do transcrito do gene *MT-CYB*, considerando o valor controlo como 100% 58
Figura 18 – Níveis do transcrito do gene *MT-ND4*, considerando o valor controlo como 100% 58
Figura 19 – Análise dos níveis de transcritos da proteína Cit B 59
Figura 20 – Análise dos níveis de transcritos da proteína ND4 60

Listagem de Tabelas

Tabela 1 – Critérios de patogenicidade para alterações em tRNA mitocondriais 15
Tabela 2 – Critérios de patogenicidade para alterações em genes que codificam proteínas mitocondriais 16
Tabela 3 – Resultado da análise *in silico* de 12 variações de sequência novas no mtDNA detetadas previamente no LBG 18
Tabela 4 – Informação prévia dos doentes em estudo 28
Tabela 5 – Enzimas de restrição usadas para o estudo do grau de heteroplasmia das alterações 34
Tabela 6 – Anticorpos primários e secundários usados no *Western-blotting* 41
Tabela 7 – Percentagem de heteroplasmia das alterações de sequência 51
Tabela 8 – Resultados da medição da atividade dos complexos da CRM, normalizados para a Citrato Sintetase, em relação aos valores controlo 57

Abreviaturas

µg:	Micrograma
µl:	Microlitro
λ:	Comprimento de onda
A:	Adenina
Ac-CoA:	Acetil-coenzima A
ADP:	Adenosina Difosfato (do Inglês, *Adenosine Di-Phosphate*)
ADPM:	Atraso no desenvolvimento psico-motor
ATP:	Adenosina Trifosfato (do Inglês, *Adenosine Tri-Phosphate*)
ATPase:	F1F0 ATP sintetase, complexo V da cadeia respiratória mitocondrial (do Inglês, *ATP synthase*)
ATP6:	Subunidade 6 da F1F0 ATP sintetase
ATP8:	Subunidade 8 da F1F0 ATP sintetase
BN-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida nativo (do Inglês,)
Bp:	Pares de bases *(do Inglês, Base pairs*)
C:	Citosina
cDNA:	DNA complementar
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
Cit B:	Citocromo b
CNC/UC:	Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra
CRM:	Cadeia Respiratória Mitocondrial
CS:	Citrato Sintetase
ddNTP:	Di-desoxi-ribonucleótidoTri-fosfato (N=A, C, T, G) (*Di-deoxi-ribonucleasideTri-phosphate*)
DEPC:	Dietilpirocarbonato *(Diethylpyrocarbonate)*
DNA:	Ácido desoxi-ribonucleico (*DeoxirriboNucleic Acid*)
dNTP:	Desoxi-ribonucleótidoTri-fosfato (N=A, C, T, G) (*Deoxi-ribonucleasideTri-phosphate*)
DTT	Ditiotreitol (do Inglês, *Dithiothreitol*)

EDTA:	Ácido etilenodinitrilo ou alfa-amino-éter etílico
EGTA:	Ácido etilenoglicol-bis ou alfa-amino-éter etílico
FAD:	Flavina-adenina di-nucleótido
$FADH_2$:	Flavina-adenina di-nucleótido reduzida
G:	Guanina
H^+:	Ião hidrogénio
H_2O:	Água
H_2O milliQ:	Água ultrapura tetra-desionizada (do Inglês, *MILIPORE MILLI-Q Plus)*
HEPES:	Ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N'-2-etane-sulfónico
KCN:	Cianeto de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LBG:	Laboratório de Bioquímica Genética
LDH:	Lactato Desidrogenase
LHON:	Neuropatia Ótica Hereditaria de Leber (do Inglês, *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*)
m-CCP:	Carbonil cianeto de m-cloro-fenil-hidrazona
MEM:	Membrana Externa Mitocondrial
$MgCl_2$:	Cloreto de Magnésio
MIM:	Membrana Interna Mitocondrial
ml:	Mililitro
mM:	Milimolar
mRNA:	RNA mensageiro
mtDNA:	DNA mitocondrial
NAD^+:	Nicotinamida-adenina di-nucleótido
NADH:	nicotinamida-adenina di-nucleótido reduzida
nDNA:	DNA nuclear
ºC:	Graus Celsius
OXPHOS:	Fosforilação oxidativa (do Inglês, *OXidative PHOSphorylation*)
PBS:	Solução salina de tampão fosfato (do Inglês, *Phosphate Buffer Saline*)
PCR:	Reação da polimerase em cadeia (do Inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PDH:	Piruvato Desidrogenase
Pi:	Fosfato inorgânico
PMSF	Floreto de fenilmetilsulfonil (do Inglês, *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*)
qPCR:	PCR quantitativo (do Inglês, *quantitative PCR)*
RFLP:	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (do Inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism)*
RNA:	Ácido ribonucleico (do Inglês, *Ribonucleic acid*)
ROS:	Espécies reativas de oxigénio (do Inglês, *Reactive Oxygen Species)*
Rpm:	Rotações por minuto
rRNA:	RNA ribossomal
RT:	Transcriptase Reversa (do Inglês*, Reverse Transcriptase)*
SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida (do Inglês, *sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis*)
SEM	Erro padrão da média (do Inglês, *Standard error of the mean*)
T:	Timina
tRNA:	RNA de transferência
UV:	Radiação ultra-violeta

Resumo

As citopatias mitocondriais são um grupo de doenças heterogéneas, causadas por defeitos no sistema mitocondrial de produção de ATP.

Este organelo tem o seu próprio genoma (mtDNA) que, quando sofre lesões/mutações, origina subunidades da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) anormais, comprometendo o bom funcionamento da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e, consequentemente, a síntese de ATP. Assim, é admissível que mutações, em qualquer gene essencial à integridade e funcionamento da CRM, possam causar alterações a nível da estrutura e função mitocondriais.

Mutações pontuais no mtDNA incluem as que causam decréscimo na síntese de proteínas mitocondriais e as que afetam alguma das 13 subunidades da CRM, codificadas por aquele genoma. Uma vez que o mtDNA é altamente polimórfico, o significado patogénico de uma nova alteração de sequência detetada, necessita de ser determinado, usando uma série de critérios antes de se poder estabelecer o diagnóstico genético.

O objetivo do presente trabalho é avaliar experimentalmente a patogenicidade de 12 novas variações de sequência no mtDNA, detetadas previamente no Laboratório de Bioquímica Genética do Centro de Neurociências e Biologia Celular, da Universidade de Coimbra (Responsável: Professora Doutora Manuela Grazina), em indivíduos portugueses com suspeita de citopatia mitocondrial, no período compreendido entre 1997 e 2010.

No sentido de avaliar o impacto das variações de sequência, foram realizados diversos estudos, nomeadamente a verificação da sua ausência em controlos, por sequenciação automática. Foi ainda efetuada a determinação do seu efeito na expressão dos níveis dos transcritos respetivos por PCR em tempo real, na quantidade de proteína, por Western-blot, e na atividade dos complexos da CRM por espectrofotometria, em fibroblastos de cultura.

Uma análise prévia *in silico* demonstrou que 4 das 12 alterações alteram o aminoácido e têm probabilidade de alterar a função da proteína, 2 alteram a estrutura de dois tRNAs e as restantes alteram o codão para outro menos frequentemente usado, no genoma mitocondrial. Os resultados experimentais obtidos no presente

trabalho para a alteração m.14771C>A, no gene *MT-CYB*, que codifica uma subunidade do complexo III da CRM, mostram que, quando comparados com os valores controlo, os níveis do transcrito respetivo estão significativamente diminuídos, por outro lado os níveis da proteína que se encontram ligeiramente diminuídos. No que diz respeito à atividade dos complexos da CRM, verificou-se um aumento significativo na atividade do complexo III, nas células estudadas.

É de notar que o presente trabalho representa uma contribuição científica original, dado que permite analisar o impacto das alterações em estudo de uma forma mais detalhada e precisa. Assim, de acordo com os critérios de patogenicidade, podemos concluir que a alteração m.12013G>A é "definitivamente" patogénica, a m.144771C>A obteve uma pontuação que permite atribuir a classificação de "provavelmente" patogénica, e as restantes alterações mantêm a previsão de "potencialmente" patogénicas, até poderem ser efetuados mais estudos.

Abstract

Mitochondrial disorders are a heterogeneous group of disorders that are caused by defects in the mitochondrial ATP production system.

This organelle has its own genome (mtDNA), that when injured leads to the formation of abnormal mitochondrial respiratory (CRM) subunits, jeopardizing the proper functioning of oxidative phosphorylation (OXPHOS) and therefore ATP syntheses. Then, mutations in any gene essential for integrity and function of CRM could cause structural and functional mitochondrial alterations.

The mtDNA point mutations include those that impair mitochondrial protein synthesis and those that affect any of the 13 CRM subunits encoded by mtDNA. Given the fact that mtDNA is highly polymorphic, the pathogenic significance of a detected novel sequence alteration needs to be determined using a series of criteria before a genetic diagnosis can be established.

With this study, we aim to evaluate the pathogenicity of 12 novel mtDNA mutations, previously detected in Biochemical Genetics Laboratory of Center of Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra (Director: Professor Manuela Grazina), found in Portuguese patients suspected of mitochondrial cytophaties, in the period from 1997 to 2010.

In order to assess the impact of these sequence variations, the study was conducted to verify their absence in controls, by automated sequencing. Furthermore, the determination of its effect in transcripts expression levels by Real-Time PCR, in protein levels by Western blot and in CRM complexes activity by spectrophotometry, using primary culture fibroblasts, was also performed.

A previous in *silico* analysis showed that 4 of the 12 sequence variations change the amino acid and have probability to alter the protein function, 2 induce alterations of tRNAs structure and the remaining alter the codon to another less frequently used codon. The experimental results obtained for the sequence variation m.14771C>A, located in *MT-CYB* gene that encodes a complex III subunit of CRM, show that, when compared with control value, the transcript expression levels are significantly decreased and protein levels that are slightly diminished. Regarding CRM to complexes activity, it is significantly increased for complex III, in these cells.

It is noteworthy that this study represents an original scientific contribution, allowing to analyze in more detail and precision the impact of these sequence variations. Therefore, according to published pathogenic criteria, we conclude that m.12013G>A mutation is considered “definitely” pathogenic, m.144771C>A mutation is “probably” pathogenic, while the remaining mutations are “potentially” pathogenic, until further studies can be performed.

1. Introdução

1.1 A Mitocôndria

1.1.1. Estrutura e Função

As mitocôndrias são organelos intracelulares essenciais em todas as células eucarióticas dependentes do metabolismo aeróbio, uma vez que são as responsáveis pela produção da maior parte da energia celular, através da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Neste organelo, ocorrem outras reações de extrema importância para a célula **(Figura 1**) como o ciclo de Krebs, a β-oxidação de ácidos gordos e a síntese de lípidos e colesterol. Além disso, a mitocôndria contribui para a regulação da homeostasia celular, tendo um papel importante na sinalização celular e apoptose. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético (Grazina, 2004; Schapira, 2006; Wallace, 2010), e defeitos na função mitocondrial podem ter consequências desastrosas no organismo humano (Schapira, 2006).

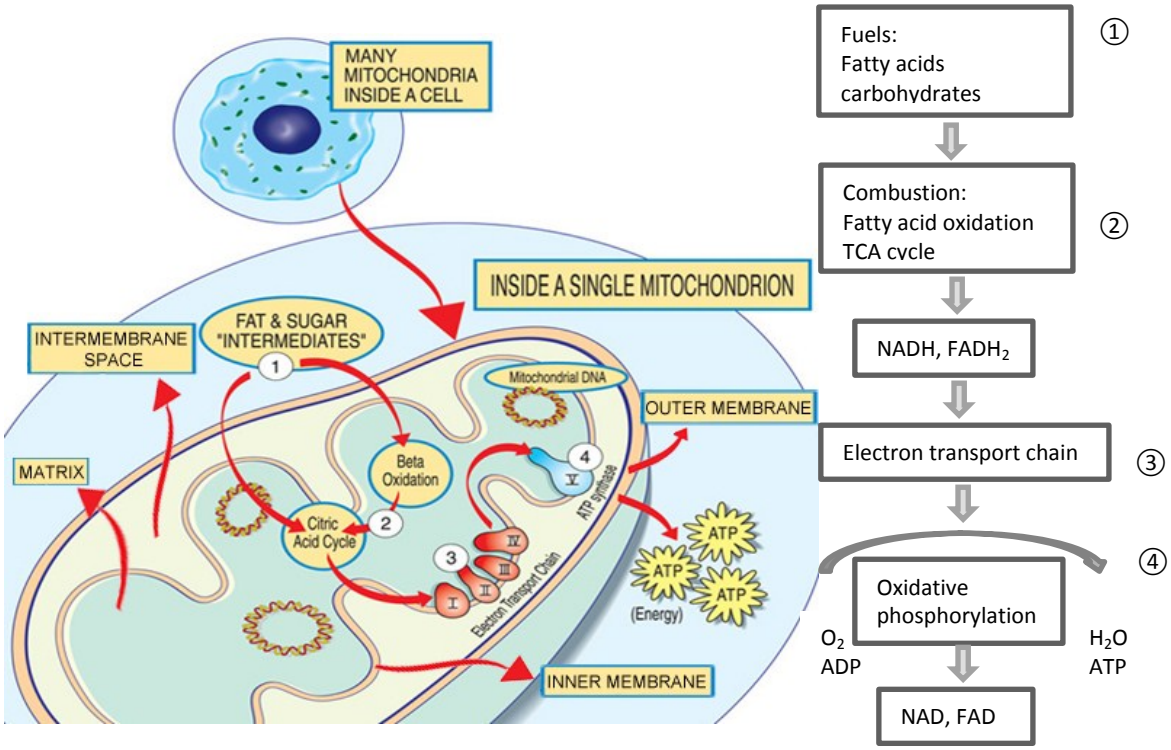

Figura 1 – A mitocôndria e vias metabólicas associadas. [Adaptado de Wong, 2010].

Através de observações por microscopia eletrónica, determinou-se a existência de membranas que dividem o conteúdo da mitocôndria em compartimentos separados (Figura 1) e dos quais depende toda a atividade deste organelo. Cada mitocôndria possui duas membranas. A membrana externa (MEM) é lisa, esférica e permeável a pequenas moléculas e iões, que se movem livremente através dos canais transmembranares. Em contraste, a membrana interna (MIM) é impermeável à maior parte de moléculas de dimensões reduzidas e iões. É na MIM que se encontram organizados grandes complexos enzimáticos, constituídos por um grande número de peptídeos, estruturados num sistema que se designa por Cadeia Respiratória Mitocondrial (CRM), onde ocorre o processo de OXPHOS. A MIM possui inúmeras dobras, designadas por cristas, que aumentam a sua área de superfície e, concomitantemente, a sua capacidade de produção de ATP (Houshmand, 2003; Grazina, 2004). Este sistema membranar especializado delimita dois compartimentos, o espaço intermembranar (entre as membranas externa e interna) e a matriz mitocondrial, envolvida pela MIM. A matriz mitocondrial contém a maioria das proteínas da mitocôndria, incluindo as enzimas do ciclo de Krebs, o complexo da piruvato desidrogenase (PDH), a via da β-oxidação dos ácidos gordos e as vias de oxidação de aminoácidos, ou seja, todas as vias de oxidação de nutrientes, exceto a glicólise, que tem lugar no citosol (Grazina, 2004).

Além disso, a mitocôndria contém ainda o seu próprio DNA (mtDNA), RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência (tRNA), RNA ribossomal e várias proteínas envolvidas na expressão genética.

Estima-se que existam cerca de 10 a 100.000 mitocôndrias por célula. No entanto, a densidade mitocondrial é variável consoante as necessidades energéticas dos tecidos; assim, as mitocôndrias são mais abundantes em órgãos ou tecidos metabolicamente mais ativos (Grazina, 2004; Schapira, 2006)

1.1.2. Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação Oxidativa

O processo de OXPHOS é o culminar de uma série de reações bioquímicas para a formação de energia pelo metabolismo, em organismos aeróbios. Todas as vias

oxidativas, na degradação de hidratos de carbono, lípidos e aminoácidos convergem, nesta fase final de respiração celular, na qual a energia de oxidação conduz à síntese de ATP (Grazina, 2004).

A OXPHOS envolve a redução de O_2 a H_2O pelos eletrões cedidos pelos equivalentes redutores – NADH e $FADH_2$ – provenientes do metabolismo intermediário, através dos complexos enzimáticos I a IV da CRM, permitindo que a energia libertada por estas reações possa ser armazenada nas ligações do ATP, por ação do complexo V, em vez de se dissipar sob a forma de calor. No entanto, a energia libertada pela oxidação do NADH e $FADH_2$ não é utilizada diretamente para a produção de ATP. Em vez disso, é utilizada para bombear protões (H^+), desde a matriz até ao espaço intermembranar, criando um gradiente de protões, através da MIM (Wallace, 2010).

Os cinco complexos enzimáticos da CRM (Figura 2) catalisam a oxidação de moléculas a partir da transferência de eletrões entre os quatro primeiros complexos enzimáticos e consequentemente promovem a formação de ATP no complexo V, pelo processo de OXPHOS: complexo I: NADH desidrogenase ou NADH – coenzima Q redutase, NQR; complexo II: succinato desidrogenase ou succinato – coenzima Q redutase, SQDR; complexo III: coenzima Q – citocromo C redutase, QCCR; complexo IV: citocromo oxidase, COX; complexo V: ATP sintetase, ATPase; existem ainda dois transportadores intermediários (coenzima Q ou ubiquinona e citocromo C) que medeiam a transferência de eletrões entre os complexos proteicos até ao O_2, ao nível da COX, convertendo-o em H_2O (Grazina, 2004; Rötig and Munnich, 2003). Durante a transferência de eletrões, forma-se o, anteriormente referido, gradiente químico de protões, do interior da mitocôndria para o espaço intermembranar, ao nível dos complexos I, III e IV. A *ATPase* permite a passagem dos protões de volta à matriz mitocondrial e usa a energia libertada por esse gradiente eletroquímico para a formação de ATP, através de ADP e Pi (Grazina, 2004).

O fluxo de eletrões é determinado pelo aumento do potencial redutor dos transportadores e é confirmado através do uso de inibidores específicos para cada complexo (rotenona – complexo I; malonato – complexo II; antimicina A – complexo III; KCN, azida, cianeto, monóxido de carbono – complexo IV; oligomicina B – complexo V), combinado com a medição do grau de oxidação de cada transportador (Grazina, 2012).

A CRM é composta por aproximadamente 100 peptídeos diferentes, sendo apenas 13 codificados por genes mitocondriais e os restantes codificados por genes nucleares. Todos os complexos da CRM têm uma dupla origem genética, exceto o complexo II, em que todas as subunidades têm origem nuclear (Rötig and Munnich, 2003). Sendo assim, é admissível que mutações, em qualquer gene essencial à integridade e funcionamento da CRM, possam causar alterações a nível da estrutura e função mitocondriais (Wong, 2010).

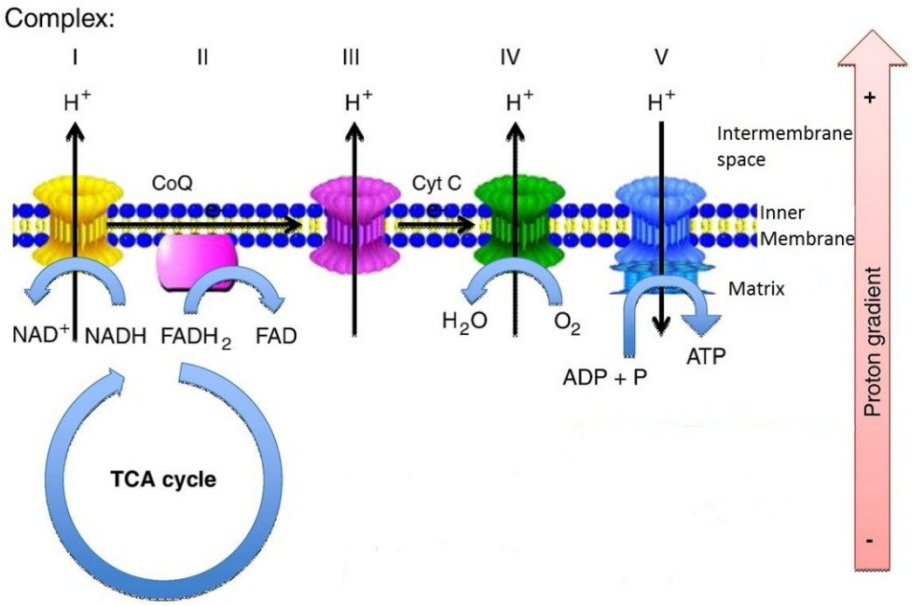

Figura 2 – Cadeia Respiratória mitocondrial e Fosforilação Oxidativa. [Adaptado de Vendelbo and Nair, 2011].

Em geral, as vias metabólicas que originam energia são reguladas de forma coordenada (Figura 1), e sendo o processo de OXPHOS a via final para a produção de energia, a sua participação nessa regulação é inevitável. Desta forma, qualquer défice na CRM tem consequências noutros metabolismos (Grazina, 2004; Wallace, 2010).

Em mitocôndrias funcionais, o processo de OXPHOS envolve a redução de O_2 a H_2O ao nível da COX. Contudo, uma pequena percentagem de O_2 não é completamente reduzida, dando origem a ROS (espécies reativas de oxigénio) que, se não forem eficazmente neutralizadas pelas defesas antioxidantes, podem danificar as principais biomoléculas, como proteínas, lípidos e nucleótidos (Kim *et al*, 2007). Quando o mtDNA é lesado, origina subunidades da CRM anormais, comprometendo o

bom funcionamento da OXPHOS e, consequentemente, a síntese de ATP (Grazina, 2004).

1.1.3. Genoma Mitocondrial

O genoma mitocondrial (mtDNA) foi descoberto nos anos 60 (Nass and Nass, 1963) e, desde então, tem sido clonado e sequenciado em diversos organismos, mostrando que todos eles possuem sensivelmente o mesmo grupo de rRNA, tRNA e algumas proteínas mitocondriais essenciais (Grazina, 2004). Existem entre centenas a milhares de mitocôndrias em cada célula e cada mitocôndria contém várias cópias (2-10) de mtDNA podendo, assim, existir cerca de 10^3-10^4 moléculas de mtDNA idênticas numa única célula (Grazina, 2004; Houshmand, 2003).

O genoma mitocondrial humano (Figura 3) é constituído por uma molécula circular fechada de DNA de cadeia dupla com assimetria na composição das suas bases: a cadeia leve é rica em pirimidinas enquanto a cadeia pesada é rica em purinas (Houshmand, 2003) com 16,568pb, presente na matriz mitocondrial. Cada molécula contém 37 genes que codificam para 2 RNA ribossomais encontrados nos ribossomas mitocondriais (12S rRNA e 16S rRNA), 22 RNA de transferência necessários para a tradução dos RNA mensageiros mitocondriais e 13 sequencias codificantes de peptídeos da CRM (Anderson *et al*, 1981). Os genes *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5* e *ND6* codificam subunidades do complexo I, o *citocromo b* (*Cit b*) codifica apenas uma subunidade do complexo III, *COX I, COX II* e *COX III* codificam subunidades do complexo IV e os genes *ATP6* e *ATP8* codificam subunidades da *ATPase* (complexo V) (Anderson *et al*, 1981; Attardi *et al*, 1982).

Existem centenas de proteínas que estão envolvidas nos processos que garantem a integridade funcional das mitocôndrias e apenas uma pequena porção é sintetizada nos organelos. Estas proteínas são codificadas no núcleo, sintetizadas no citoplasma e importadas para o organelo, onde são posteriormente distribuídas pelos vários compartimentos. O código genético do mtDNA é diferente do código genético nuclear; contudo, a replicação e transcrição do mtDNA dependem de fatores de origem nuclear

(como a DNA Polimerase Gama – POLG) sendo, por isso, considerada a existência de uma regulação semi-autónoma com as sequências reguladoras essenciais localizadas na região *D-loop* (pequena região reguladora, com sequência não codificante com cerca de 1.000pb) (Grazina, 2004).

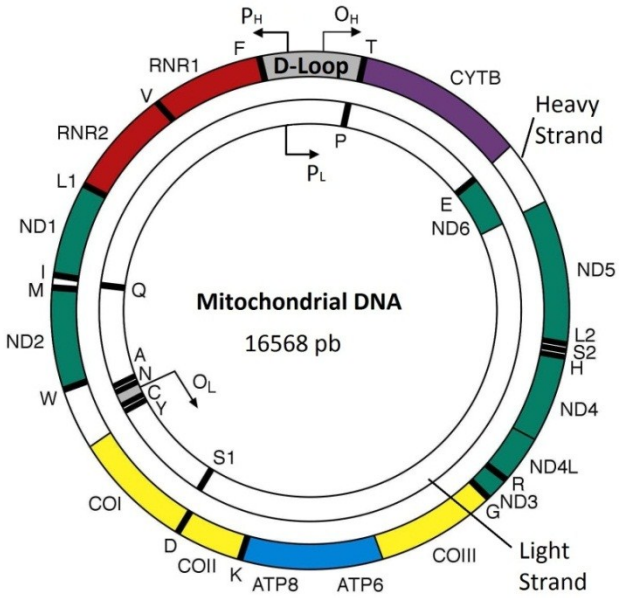

Figura 3 – Genoma Mitocondrial Humano.
[Adaptado de Greaves *et al*, 2012].

A replicação do mtDNA é bi-direcional, com início na origem de replicação da HC até atingir o final da cadeia, onde a LC começa a replicar-se em sentido contrário à HC. A transcrição decorre a partir dos promotores da cadeia leve (P_L) e pesada (P_H), que funcionam em direções contrárias, sendo a cadeia HC transcrita no sentido dos ponteiros do relógio (Grazina, 2004).

O mtDNA de mamíferos é extremamente compacto e alguns genes chegam mesmo a sobrepor-se; quase todos os pares de bases estão incorporados num gene, dando a ideia de ter evoluído no sentido de conter apenas as sequências necessárias para formar os mRNA, tRNA e rRNA (Attardi, 1982).

Durante a divisão celular, as mitocôndrias são distribuidas aleatoriamente em células filhas (segregação mitótica). Este fenómeno explica o facto de certos doentes, com doenças relacionadas com o mtDNA, poderem mudar de um fenótipo clínico para outro, com o avançar da idade (DiMauro, 2007). Em geral, todas as moléculas de

mtDNA são idênticas (situação designada de homoplasmia), mas pode ser encontrada uma mistura de mtDNA do tipo “normal” e “mutante” na mesma mitocôndria. Esta situação é designada por heteroplasmia (Holt *et al*., 1988). A distribuição aleatória das cópias mutadas de mtDNA nas mitocôndrias, nas células e nos tecidos, forma “mosaicos” de células (Figura 4) com diversas percentagens de cópias mutadas em relação ao número de moléculas de mtDNA normais, podendo encontrar-se desde células com todas as cópias normais (homoplasmia normal) a células com todas as moléculas mutadas (homoplasmia mutante), passando por vários graus de heteroplasmia.

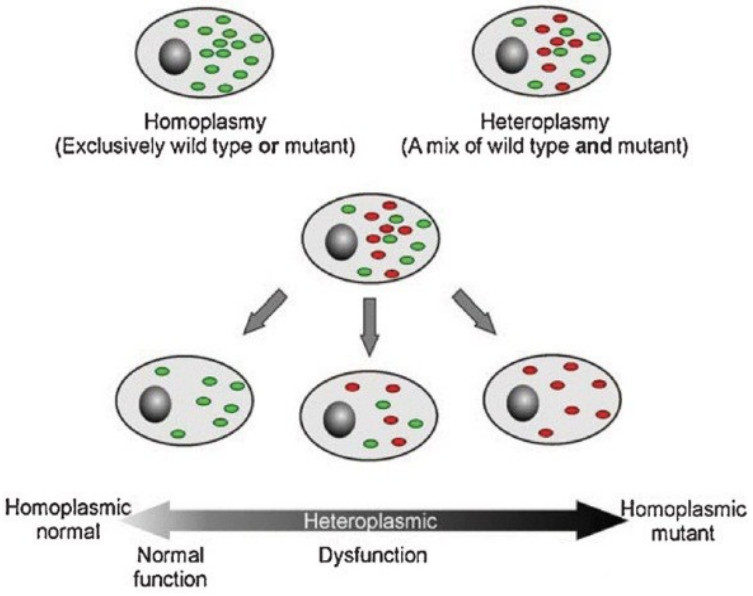

Figura 4 – Segregação mitótica e heteroplasmia.
[Adaptado de https://www.thieme-connect.de/ejournals/html].

O facto da distribuição nas células e nos tecidos ocorrer, aparentemente, ao acaso, torna imprevisível o grau de transmissão duma alteração para a geração seguinte. Em consequência destes factos, a percentagem de mtDNA mutado pode mudar de tecido para tecido e mesmo ao longo da vida (DiMauro and Schon, 2001; Rötig and Munnich, 2003; Grazina, 2004). Deste modo, existe um limiar crítico a partir do qual surge um fenótipo de acordo com as alterações no mtDNA, sendo que este varia entre indivíduos da mesma família e consoante o órgão ou tecido em cada indivíduo (Macmillan *et al*, 1993).

Além das características particulares já descritas deste genoma, há outras que merecem destaque. É o caso da hereditariedade, que ocorre apenas por via materna (Giles *et al*, 1980), uma vez que só as mitocôndrias do óvulo permanecem após a fecundação. Também é importante referir que, por ser um genoma codificante quase na sua totalidade, tem como vantagem um "empacotamento económico". No entanto, este facto torna-se uma desvantagem quando se tem em conta a elevada taxa de mutações, em relação ao nDNA, e os mecanismos de reparação pouco eficientes. Uma vez que possui maioritariamente sequências codificantes, a probabilidade de uma alteração ser lesiva é muito superior (Grazina, 2004). Além disso, também a proximidade da fonte celular de ROS e a ausência de histonas protetoras, contribuem para que ocorram mais danos no mtDNA (Wong, 2010). Esta aumentada suscetibilidade do mtDNA para os danos leva a uma frequência de mutações muito maior do que no DNA nuclear (Wallace, 2010).

O facto das subunidades dos complexos serem codificadas também por genes nucleares enaltece a importância da coordenação e cooperação entre os dois genomas, para o bom funcionamento da CRM, podendo a disfunção mitocondrial ser resultado de mutações no genoma mitocondrial ou nuclear, ou ainda de fatores ambientais (Figura 5).

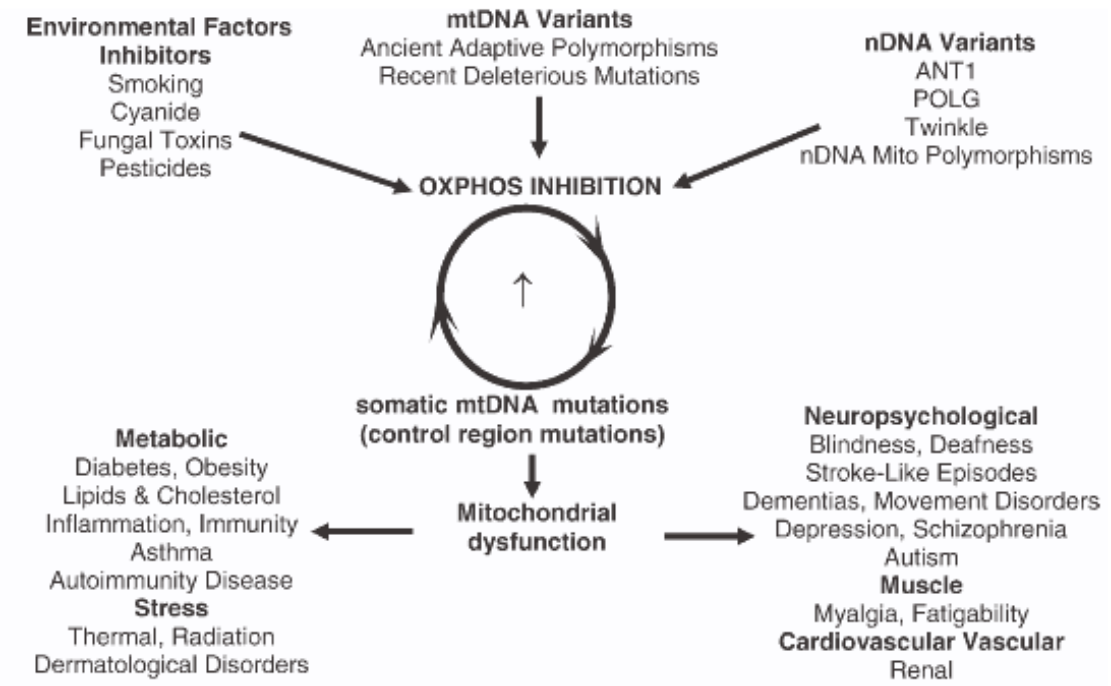

Figura 5 – Causas de mutações que provocam disfunção da CRM. [Adaptado de Wallace, 2010]

1.2 Citopatias Mitocondriais

Até recentemente, as doenças mitocondriais eram consideradas doenças raras de puro interesse académico. Contudo, nos últimos 15 anos tem surgido um maior interesse nas doenças mitocondriais humanas. Diversos estudos epidemiológicos, nos anos mais recentes, têm confirmado que as doenças mitocondriais estão, de facto, entre as doenças genéticas do metabolismo mais comuns e representam um grande peso económico para a sociedade (DiMauro, 2007).

As citopatias mitocondriais são um grupo de doenças clinicamente heterogéneas que são causadas por defeitos no sistema de produção de ATP mitocondrial (Rodenburg, 2011). A interrupção no fornecimento de ATP tem consequências graves para as células, e mesmo pequenas reduções na eficiência da produção de ATP pode ser suficiente para causar sintomas (McFarland and Turnbull, 2009). Um decréscimo na função da CRM leva a uma variedade de consequências metabólicas que são relevantes para a patologia da doença, podendo atingir qualquer órgão ou tecido ou órgãos não relacionados, com apresentação muscular/neurológica ou extra-muscular, com associações de sintomas inexplicáveis, com decurso rápido, associadas a qualquer tipo de hereditariedade e em qualquer idade (Greaves *et al*., 2012).

A apresentação clínica dos doentes é extremamente heterogénea e têm sido descritos poucos doentes com a mesma mutação, o que dificulta o estabelecimento da correlação genótipo-fenótipo (Rötig, 2011). A mesma característica clínica pode estar relacionada com duas mutações diferentes e uma mutação específica pode resultar em pelo menos dois fenótipos distintos (McFarland and Turnbull, 2009). O diagnóstico é difícil de estabelecer quando ocorre apenas o primeiro sintoma, tornando-se mais fácil quando são observados pelo menos dois sintomas aparentemente não relacionados (Rötig and Munnich, 2003).

Esta variabilidade clínica ocorre principalmente devido à dupla origem genética e ao elevado número de moléculas de mtDNA em cada célula, podendo estas coexistir na forma mutante e *wild type* no mesmo órgão e/ou tecido.

As doenças mitocondriais podem ser causadas por mutações no nDNA ou no mtDNA (DiMauro and Schon, 1998), uma vez que a maioria das proteínas da CRM é codificada por genes nucleares. Além disso, há um grande número de proteínas,

codificadas por genes nucleares, que estão envolvidos na montagem e estabilidade dos complexos da CRM, no processamento e manutenção do mtDNA e outras proteínas essenciais para o bom funcionamento da CRM, como proteínas envolvidas nas características morfológicas das mitocôndrias, enzimas antioxidantes e vários transportadores de ferro, fosfato e citratos (Rötig and Munnich, 2003). Assume-se que a mitocôndria contenha mais de 1.000 proteínas diferentes, cujos genes que as codificam são possíveis candidatos para doenças mitocondriais (Rötig and Munnich, 2003).

1.2.1. Alterações genéticas como causa de citopatias mitocondriais

A mitocôndria, apesar de possuir o seu próprio DNA, depende de fatores codificados pelo nDNA para a sua replicação, reparação, transcrição e tradução, o que faz com que o mtDNA não seja totalmente autónomo (Grazina, 2004). Esta dependência acaba por influenciar a manifestação de determinadas patologias humanas, que se caracterizam por alterações no mtDNA em consequência de erros que afetam fatores codificados pelo nDNA (Schapira, 2006).

As doenças mitocondriais devido a mutações no nDNA são mais abundantes, não apenas pelo elevado número de subunidades da CRM codificadas por este genoma, mas também pelo facto da correta "montagem" e funcionamento da CRM requerer vários passos com controlo do nDNA. As mutações em genes nucleares dizem respeito às que afetam genes estruturais da CRM, genes envolvidos na montagem dos complexos e genes envolvidos na manutenção e estabilidade do mtDNA (Rötig and Munnich, 2003).

As citopatias mitocondriais, causadas por mutações no mtDNA, dividem-se em três grandes classes, isto é, mutações pontuais, rearranjos e depleção (redução drástica no número de cópias de mtDNA), e têm sido descritas com uma grande variedade de fenótipos, como LHON (Neuropatia Ótica Hereditária de Leber), MELAS (Miopatia Mitocondrial, Acidose Láctica e episódios tipo AVC), NARP (Neuropatia, ataxia e retinite pigmentar), MILS (Síndrome de Leigh de hereditariedade materna),

MERRF (Epilepsia Mioclônica com fibras vermelhas rasgadas), entre outras (Schapira, 2006).

As mutações pontuais no mtDNA são transmitidas por hereditariedade materna e incluem as que causam decréscimo na síntese de proteínas mitocondriais e as que afetam uma das 13 subunidades da CRM codificada pelo mtDNA (DiMauro, 2007). A síntese deficiente de proteínas pode ser causada por mutações em qualquer componente do aparelho de tradução (Figura 6), nomeadamente tRNAs e rRNAs, e por sua vez as alterações que afetam as subunidades da CRM são causadas por substituições de aminoácidos, resultando em deficiências no funcionamento da OXPHOS (Rötig, 2011).

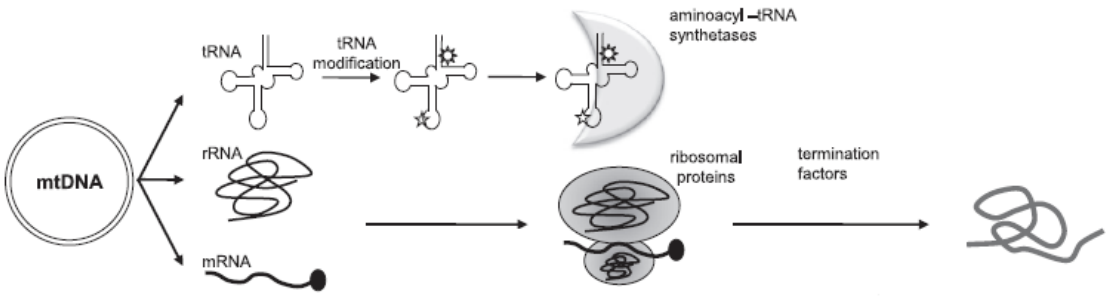

Figura 6 – Síntese de proteínas mitocondriais. [Adaptado de Rötig, 2011].

A segunda classe de doenças envolve as deleções no genoma mitocondrial. Embora os tamanhos e as posições das deleções difiram marcadamente entre doentes, afetam, normalmente, múltiplas enzimas da CRM, uma vez que atingem as sequencias codificadoras de vários genes estruturais e tRNAs (Rötig and Munnich, 2003). Geralmente, são esporádicas, heteroplásmicas e únicas, ocorrendo frequentemente entre sequências repetidas, o que sugere que são causadas por arranjos *de novo* durante a oogénese ou no início do desenvolvimento (Rötig and Munnich, 2003).

A última classe de doenças relacionadas com o mtDNA diz respeito à depleção, que originam falhas graves no sistema respiratório, no músculo, no fígado e pulmões na infância, frequentemente fatais, e são consistentes com uma hereditariedade autossómica recessiva (Rötig and Munnich, 2003).

Estas mudanças quantitativas no conteúdo do mtDNA são causadas por mutações primárias em genes nucleares responsáveis pela biossíntese de mtDNA (Wong, 2010).

Em 1988, foram publicados trabalhos com referência às primeiras mutações patogénicas no mtDNA (Holt *et al*., 1988; Wallace *et al.,* 1988). Desde essa data, muitas mutações novas continuam a ser publicadas e registadas, especialmente em genes que codificam proteínas (DiMauro and Davidzon, 2005). Atualmente, estão registadas mais de 400 mutações no mtDNA descritas com possível caráter patogénico (MITOMAP, 2012). Além disso, tem sido estimado que a prevalência de mutações patogénicas no mtDNA é pelo menos de 1:200, no Reino Unido (Elliott *et al*., 2008). Contudo, a prevalência das doenças mitocondriais, no Reino Unido, ou o risco de desenvolver uma doença mitocondrial, na população Holandesa, tem sido estimada em cerca de 1:10.000 e 1:6.000, respetivamente (Schaefer *et al*., 2008; Rodenburg, 2011), embora a prevalência das citopatias mitocondriais seja difícil de calcular, devido à heterogeneidade clinica e ao número de mutações que causam doença. O facto da prevalência de uma mutação patogénica no mtDNA ser muito alta, em relação à prevalência das doenças mitocondriais, é explicado pelos baixos níveis de heteroplasmia de algumas mutações patogénicas nos tecidos (Greaves *et al*., 2012).

1.2.2. Critérios de Patogenicidade para alterações no DNA mitocondrial

Uma vez que o mtDNA é altamente polimórfico, o significado patogénico de uma nova alteração de sequência detetada, necessita de ser determinada, usando uma série de critérios antes de se poder estabelecer o diagnóstico genético (Wong, 2007). Atualmente, apenas estão confirmadas cerca de 50 mutações pontuais no mtDNA, responsáveis por darem origem a citopatias mitocondriais (MITOMAP, 2012).

Após DiMauro e Schon, em 2001, descreverem sucintamente critérios canónicos de patogenicidade para mutações pontuais no mtDNA, foram feitos alguns ajustes devido a existirem algumas mutações, descritas como patogénicas, que não cumpriam estes critérios. Em 2004, foram criados os primeiros critérios de pontuação aplicados em particular às mutações em tRNA mitocondriais (MacFarland *et al*., 2004). Desde 2005, que o conjunto de critérios canónicos tem sido reformulado (DiMauro and

Davidzon, 2005; Montoya *et al.,* 2009)**.** Contudo, uma comparação entre as diferentes formas de critério (Yarham *et al.,* 2011) avalia o sistema de pontuação como mais correto por aumentar a precisão da atribuição de patogenicidade, o que é essencial, já que tem impacto na precisão do aconselhamento genético. Deste modo, existem dois sistemas de pontuação a seguir: o sistema de pontuação de patogenicidade aplicado para as mutações em tRNA mitocondriais (Yarham *et al*, 2011) (Tabela 1) e um sistema de pontuação para mutações em genes que codificam proteínas (Wong, 2007) (Tabela 2).

Tabela 1 – Critérios de patogenicidade para alterações em tRNA mitocondriais. [Adaptado de Yarham *et al*, 2011].

Critérios de pontuação		**Pontuação/20**
Mais de um caso, independentes, publicados	Sim	2
	Não	0
Conservação evolutiva	Uma alteração	2
	Duas alterações	1
	Múltiplas alterações	0
Variante heteroplásmica	Sim	2
	Não	0
Segregação da mutação com a doença	Sim	2
	Não	0
Evidência histoquímica de doença mitocondrial	Forte evidência	2
	Fraca evidência	1
	Nenhuma evidência	0
Defeito Bioquímico nos complexos I, III, ou IV	Sim	2
	Não	0
Evidência de segregação da mutação com defeito bioquímico através de estudos *single-fiber*	Sim	3
	Não	0
Estudos dos níveis *steady-state* de mt-tRNA mutados ou evidências de patogenicidade em estudos com cíbridos mitocondriais	Sim	5
	Não	0

≤6 Pontos – polimorfismos neutros
7-10 Pontos – possivelmente patogénico
11-13 Pontos (não incluindo evidência através de *single-fiber*, níveis de *steady-state*, ou estudos com cíbridos) – provavelmente patogénico
≥11pontos (incluindo evidências através de *single-fiber*, níveis de *steady-state*, ou estudos com cíbridos) – definitivamente patogénico

Além dos critérios mencionados, uma das primeiras avaliações a considerar para a atribuição de patogenicidade a uma variação de sequência nova é a sua ausência em controlos saudáveis, excetuando os familiares portadores da linha materna (Montoya *et al*., 2009).

Tabela 2 – Critérios de patogenicidade de alterações em genes que codificam proteínas mitocondriais. [Adaptado de Wong, 2007].

Critérios	Condições	Pontuação Máxima
Defeitos bioquímicos	Demonstrados num tecido afetado Demonstrados em múltiplos tecidos	8 +2
Estudos funcionais	PCR de fibras ou estudos com cíbridos, ou usando outros métodos, tal como *western blot*, cinética enzimática, imunohistoquímica.	7 ou 4
Múltiplos relatos da mutação em doentes não aparentados		5
Heteroplasmia		5
Segregação da variante com a doença dentro da família		3
Conservação evolutiva* em organismos		10
Total (máximo)		40

0-9 Pontos – improvavelmente patogénica
10-19 Pontos – possivelmente patogénica
20-29 Pontos – provavelmente patogénica
30-40 Pontos – definitivamente patogénica

*Conservação Evolutiva foi avaliada por comparação de sequências de aminoácidos a partir da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), ouriço-do-mar (*Strongylocentrotus purpuratus*), mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), rã (*Xenopus laevis*), ratinho (*Mus musculus*), vaca (*Bos Taurus*), e humano (*Homo sapiens*).

Estes sistemas de critérios fornecem as pistas essenciais para uma abordagem mais focada e eficiente quando se pretende comprovar a patogenicidade de uma mutação no mtDNA, de forma a conseguir realizar um diagnóstico genético fiável e sem variabilidade laboratorial (Wang *et al,* 2012).

Ao longo de 15 anos de prática laboratorial associada ao diagnóstico, foram encontradas mais de cem de variações de sequência novas em mtDNA humano, no Laboratório de Bioquímica Genética (LBG) do Centro de Neurociências e Biologia Celular e Molecular da Universidade de Coimbra (CNC/UC).

Dadas 49 variações de sequência no mtDNA, não descritas na literatura até à presente data (Julho, 2012), de acordo com um estudo *in silico* prévio, 12 dessas alterações merecem destaque devido ao seu carácter potencialmente patogénico. As 12 alterações foram selecionadas após uma análise *in silico* que incluiu avaliação da conservação evolutiva do nucleótido e do aminoácido, da alteração da estrutura nos tRNAs, da previsão do impacto das alterações dos aminoácidos na função e estrutura da proteína e da frequência da utilização do codão na síntese proteica mitocondrial.

Os nucleótidos e/ou aminoácidos do mtDNA, que correspondem ao local das alterações em estudo, foram considerados totalmente ou quase na totalidade conservados, tendo em conta diversas espécies (desde a mosca da fruta até ao humano), de acordo com o alinhamento dos genes respetivos. Tendo em conta este parâmetro, os resultados que dizem respeito ao impacto dessas alterações estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado da análise *in silico* de 12 variações de sequência novas no mtDNA detetadas previamente no LBG (1997-2010).

Alteração do Nucleótido	Gene	Alteração do codão	Alteração do aminoácido	Tipo de mutação	Tipo de substituição de base	Previsão da Patogenicidade
m.3624A>G	*ND1*	CTA→CTG	p.L106L	Sinónima	Transição	Frequência da utilização do codão: 70.0%→13.1%
m.3708A>G	*ND1*	CGA→CGG	p.R134R	Sinónima	Transição	Frequência da utilização do codão: 6.5%→0.8%
m.4664C>T	*ND2*	ACC→ACT	p.T65T	Sinónima	Transição	Frequência da utilização do codão: 41.5%→14.6%
m.7496T>C	*TS1*	CAT→CAC	tRNA ^{ser1}	Sinónima	Transição	*RNAfold®*: Altera a estrutura
m.8418T>C	*ATP8*	CTT→CCT	p.L18P	*Misense*	Transição	PolyPhen2®: Provavelmente patogénica SIFT®: afeta a função da proteína
m.9166T>C	*ATP6*	TTC→CTC	p.F214L	*Misense*	Transição	PolyPhen2®: Provavelmente patogénica SIFT®: afeta a função da proteína
m.11977C>T	*ND4*	TAC→TAT	p.Y406Y	Sinónima	Transição	Frequência da utilização do codão: 22.2%→12.9%
m.12013A>G	*ND4*	TCA→TCG	p.S418S	Sinónima	Transição	Frequência da utilização do codão: 19.2%→2.4%
m.14706A>G	*TE*	TGA→TGG	tRNA ^{glu}	Sinónima	Transição	*RNAfold®*:Altera a estrutura
m.14771C>A	*CYB*	CCC→ACC	p.P9T	*Misense*	Transversão	PoyPhen2®: provavelmente patogénica SIFT®: afeta a função da proteína
m.14839A>G	*CYB*	TGA→TGG	p.W31W	Sinónima	Transição	Frequência da utilização do codão: 21.6%→2.4%
m.15246G>A	*CYB*	GGC→GAC	p.G167D	*Misense*	Transição	PolyPhen2®: Provavelmente patogénica SIFT®: afeta a função da proteína

Nas últimas décadas, com os enormes avanços da Biologia Molecular, foi possível alcançar novos conhecimentos no estudo das citopatias mitocondriais. Contudo, alguns mecanismos e o papel patogénico de muitas mutações continuam ainda por esclarecer.

2. Objetivos

De acordo com a informação obtida previamente, e tendo em conta os critérios de patogenicidade publicados, pretendemos alcançar três objetivos principais:

1) Avaliar experimentalmente a patogenicidade de novas variações de sequência no mtDNA de indivíduos portugueses com suspeita de citopatia mitocondrial;

2) Procurar correlacionar o fenótipo dos doentes com o genótipo e os estudos funcional e bioquímico;

3) Estabelecer o diagnóstico genético dos indivíduos relativamente às alterações em estudo (referidos na tabela 3).

3. Metodologia

3.1 Amostras Biológicas

A amostragem deste estudo inclui 12 doentes portugueses (7 do sexo masculino e 5 do sexo feminino), com suspeita de citopatia mitocondrial, provenientes da unidade de Doenças Metabólicas do Hospital Pediátrico – Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E. (3 doentes), da unidade de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, HUC (5 doentes), da unidade de Pediatria do Hospital Amadora Sintra, Centro Hospitalar de Lisboa, E.P.E. (1 doente) e da unidade de Pediatria do Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, E.P.E. (3 doentes).

Foram usadas amostras de indivíduos portugueses saudáveis voluntários como controlos em alguns procedimentos.

Todas as amostras foram enviadas com consentimento informado, tendo sido também consideradas outras questões éticas, sociais e legais, como a proteção da privacidade dos doentes intervenientes e a confidencialidade dos respetivos dados.

As amostras dos doentes foram enviadas para o LBG no âmbito do diagnóstico bioquímico e genético.

Para o rastreio genético e bioquímico executado previamente a este estudo, foram usadas amostras de tecidos como o músculo, fígado, coração e sangue. As amostras de tecido foram obtidas através de biópsia durante intervenções cirúrgicas e a colheita de sangue periférico foi obtida por punção venosa. A extração de DNA total e a sua quantificação foi efetuada no laboratório de acolhimento – LBG, por métodos padronizados (Grazina, 2004). Com base nos resultados obtidos através dos procedimentos efetuados previamente, foram sumarizados os dados relativos aos doentes em estudo (Tabela 4), incluindo a descrição das novas alterações do mtDNA referidas no final do capítulo 1 (Introdução). A média das idades dos doentes é 18 ± 14, sendo a idade máxima 49 anos e a mínima 5 anos.

O rastreio genético de controlos foi efetuado através de amostras de DNA de sangue, extraído previamente no LBG, pelo método acima mencionado. As amostras foram provenientes de indivíduos voluntários que não apresentavam sinais ou sintomas característicos de citopatias mitocondriais.

Tabela 4 – Informação prévia dos doentes em estudo.

Doente	Alteração no mtDNA	Gene	Atividade dos complexos da CRM	Alterações Clinicas
1	m.8418T>C	*ATP8*	Linfócitos - II: 45,0%; III: 283,7%; IV: 47,0%	Perda de visão bilateral, suspeita de LHON
2	m.9166T>C m.3708A>G	*ATP6* *ND1*	Linfócitos - II: 59,0%; III: 111,4%; IV: 47,6%	Neuropatia ótica bilateral
3	m.15246G>A m.12013A>G	*CYB* *ND4*	Linfócitos - II: 64,5%; III: 121,2%; IV: 76,5%	ADPM, macrocefalia e surdez
4	m.7496T>C	*TS1*	Musculo - I: 57,0%; II: 55,2%; III: 187,3%; IV: 21,1%; V: 132,5%	Miopatia
5	m.12013A<G	*ND4*	Musculo - I: 70,7%; II: 46,6%; III: 73,3%; IV: 64,5%; V: 46,4%	Microcefalia, surdez, cardiomiopatia congénita, atraso estato-ponderal
6	m.12013A<G	*ND4*	Musculo - I: 89,9%; II: 64,2%; III: 387.0%; IV: 13,3%; V:30,5%. Linfócitos - II: 70,5%; III: 45,9%; IV: 15,0%	Síndrome de Leigh, ataxia, tremores e má progressão estato-ponderal, convulsões, distonia
7	m.14839A>G	*CYB*	Musculo - I: 17,8%; II: 39,4%; III: 239,0%; IV: 12,8%; V: 18,4% Linfócitos - II: 49,3%; III: 41,4%; IV: 35,4%	Atraso estato-ponderal, microcefalia, retinite pigmentar
8	m.3624A>G	*ND1*	Musculo - I: 74,1%; II: 39,6%; III: 67,0%; IV: 48,3%; V: 108,6% Linfócitos - II: 50,7%; III: 126,6%; IV: 32,9%	Atraso cognitivo, hipotonia generalizada
9	m.11977C>T	*ND4*	Linfócitos - II: 77,6%; III: 66,0%; IV: 59,5%	ADPM, retinite pigmentar, distonia generalizada, encefalopatia epilética, atrofia ótica bilateral
10*	m.14706A>G	*TE*	Musculo - I: 30,3%; II: 56,7%; III: 72,4%; IV: 46,9%; V: 191,8% Fígado - I: 21,2%; II: 39,7%; III: 48,1%; IV: 30,7%; V: 34,2%	Má progressão ponderal, vómitos frequentes
11	m.4664C>T	*ND2*	Não efetuado	ADPM, infeção respiratória de repetição, epilepsia
12	m.14771C>A	*CYB*	Não efetuado	ADPM grave, ataxia, hipotonia, estrabismo, ausência de linguagem

Legenda: ADPM – Atraso no desenvolvimento psico-motor; *Falecido

No decorrer deste estudo, foram usadas alíquotas de amostra diluídas, para manter a integridade e reduzir o risco de contaminação do *stock.*

Para analisar o efeito das alterações no mtDNA em estudo, através da análise de RNA e proteínas, foram usados fibroblastos em cultura provenientes de biópsias de pele de um doente com suspeita de citopatia mitocondrial (doente 12), e de dois indivíduos controlo (controlos negativos 1 e 2) e a uma doente (mutante m.11778G>A) com diagnóstico genético de citopatia mitocondrial (LHON) que apresenta a mutação m.11778G>A considerada patogénica (Grazina *et al*, 2007).Os fibroblastos desta doente encontravam-se criopreservados e foram colocados em cultura.

Até à data da realização deste trabalho, não foi possível obter outras amostras de fibroblastos para análise.

No decorrer do estudo, todos os materiais (pontas para pipetas e tubos) e soluções utilizados eram estéreis.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA total foi efetuada a partir do sedimento de fibroblastos, usando o método do fenol:clorofórmio. O sedimento foi incubado com 10mg/ml de Proteinase K provocando a desnaturação de proteínas e a exposição do DNA. A mistura fenol:clorofórmio foi aplicada para obtenção de DNA com alto grau de pureza, através de centrifugação (2000 rpm, a 4°C durante 10min). A fase aquosa, que contém o DNA, foi precipitada com etanol absoluto permitindo observar o aparecimento da medusa de DNA. Posteriormente, várias lavagens com etanol a 70% permitiram remover resíduos de sais, fenol e clorofórmio, para a obtenção de DNA puro.

O DNA foi ressuspenso em TRIS-EDTA (TE) conferindo-lhe estabilidade, e guardado a 4°C até à sua completa solubilização.

3.2.2. Quantificação de DNA

A quantificação de DNA das amostras foi efetuada através de um método espectrofotométrico (260nm), com o equipamento *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA), usando o *software NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* v.3.7 (Thermo Scientific). A leitura de densidade ótica determina a quantidade de DNA, a 260 nm, e a existência de substâncias contaminantes (maioritariamente proteínas), a 280 nm. A razão das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm deve estar situada entre 1,8 e 2,0, indicando que a amostra apresenta um grau de pureza adequado para análise posterior.

3.2.3. Reação da Polimerase em cadeia (PCR)

A técnica da PCR tem como base o princípio da replicação *in vivo* pela DNA polimerase. Esta técnica consiste numa série de reações, em que há amplificação de fragmentos específicos de DNA, permitindo a obtenção de múltiplas cópias de DNA a partir de uma única cadeia.

Para a realização de uma reação de PCR, é necessária uma sequência molde que contenha o segmento de DNA a amplificar, uma DNA polimerase (*Taq* polimerase), *primers* complementares à cadeia de DNA, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) que a DNA polimerase vai adicionar ao *primer* para formação da nova cadeia, e solução tampão, que mantém o pH do meio adequado. Além disso, outros reagentes poderão ser necessários, como o caso do $MgCl_2$ que aumenta a estabilidade da enzima e da cadeia de DNA.

Para amplificação dos fragmentos do mtDNA do presente trabalho, foi feita uma mistura de PCR para cada região em estudo usando dNTPs a 200µM (GE Healthcare, UK), *primer forward* e *reverse* a 1µM (Gibco Invitrogen) adequados a cada região, de solução tampão 1X, $MgCl_2$ a 1,5µM, enzima *Taq* polimerase 0,9U/µl (Fermentas), 50-150ng de DNA, e H_2O para 30µl de volume total de reação. Os *primers* usados para a amplificação dos genes de interesse permitiram rastrear 8 regiões do mtDNA: 3000-3750, 3900-4700, 7100-7500, 8100-8450, 8800-9300, 11400-12050, 14300-14850 e 15000-15400.

A reação decorreu num termociclador, através da execução de um programa de 30 ciclos constituído por 3 fases que se realizam a temperaturas diferentes: desnaturação (95°C), *annealing* (56-60°C) e extensão (72°C).

Para cada reação de PCR foi amplificado um branco em que o DNA foi substituído por água como controlo negativo, para avaliar a possibilidade de contaminação.

3.2.4. Eletroforese em gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose permite a separação e identificação de moléculas de DNA, através da aplicação de um campo elétrico, que vai fazer com que os iões e moléculas carregados negativamente se desloquem para o ânodo, enquanto os compostos carregados positivamente migram para o cátodo. Assim, a utilização da eletroforese é eficaz na determinação do sucesso da reação de PCR, uma vez que o DNA possui a capacidade de migrar quando aplicado um campo elétrico, dado que que possui carga. A preparação de um gel de agarose inclui a adição de brometo de etídeo, para a marcação das moléculas de DNA, que permite a visualização dos fragmentos quando sujeitos a radiação ultravioleta (UV).

No presente trabalho, foram usados géis de agarose 1% (Lonza Rockland, ME, USA), de forma a visualizar a amplificação dos fragmentos do mtDNA pretendidos. Na preparação do gel, foi utilizada a solução tampão Tris/Borato - EDTA (TBE) 1x e brometo de etídeo 1mg/ml.

Na análise dos fragmentos, a eletroforese decorreu em equipamento apropriado, a uma voltagem de 80-200 mV, tendo sido usados 5 µL de produto de PCR e 2 µL de *Loading Buffer* (LB). No sentido de confirmar se os fragmentos eram os pretendidos, foi utilizado o marcador de peso molecular pUC 9/ mspI 23 (Fermentas), para comparação do peso molecular.

Após a eletroforese, os géis foram observados no equipamento *ChemiDOC™* XRS (Bio-Rad), com recurso ao *software Quantity One* v 4.6.9 (Bio-Rad), e os resultados registados em fotografia.

3.2.5. Purificação dos produtos da PCR de amplificação

Esta etapa é muito importante por permitir a eliminação de componentes da reação de amplificação (*primers*, dNTPs, etc..) que poderiam interferir nas reações seguintes.

Foi utilizada a *ExoSAP-IT®* (USB® Corporation, Cleveland, Ohio, USA) para a purificação. Este composto é constituído por duas enzimas hidrolíticas e uma solução tampão específica e foi adicionado aos produtos da PCR de amplificação (1:5), após a reação. A *ExoSAP-IT* é inactivada por incubação a 80°C.

3.2.6. PCR de sequenciação

Nesta fase, há adição de uma mistura de reação ao produto purificado da PCR de amplificação, com o objetivo de sequenciar posteriormente os fragmentos de DNA.

Para proceder à reação de sequenciação dos fragmentos de mtDNA de interesse foram utilizados, para além dos produtos de PCR de amplificação purificados, um *primer* (Gibco Invitrogen) – *forward* ou *reverse* – para cada fragmento e *Big Dye® Terminator 1.1 Sequencing Standard Kit* (Applied Biosystems, Warrington, UK) (8µl/amostra). Este contém dNTPs e ddNTPs (di-desoxirribonucleótido Tri-fosfato), marcados com os quatro fluoróforos diferentes, tampão e DNA polimerase. A DNA polimerase catalisa a extensão do primer, por adição de diferentes dNTPs pela ordem determinada pela cadeia de DNA modelo. Quando um ddNTP é adicionado, deixa de ser possível estabelecer uma ligação fosfodiéster com o dNTP subsequente, terminando a extensão. Assim, são originados fragmentos de DNA com diferentes tamanhos.

3.2.7. Purificação dos produtos do PCR de sequenciação

A purificação efetuada após a PCR de sequenciação tem como objetivo a remoção de terminadores contidos nos produtos de PCR.

No presente trabalho, recorreu-se ao uso de Sephadex™ G-50 (GE Healthcare, UK). O produto de PCR é aplicado sobre esta resina, e por centrifugação, os componentes

indesejáveis à reação seguinte ficam retidos, permitindo a purificação dos produtos a utilizar no procedimento seguinte.

3.2.8. Sequenciação automática de DNA

A sequenciação automática de DNA permite determinar a sequência dos nucleótidos num determinado fragmento de DNA, através de um sequenciador automático.

Este método baseia-se na capacidade da DNA polimerase incorporar ddNTPs, na terminação da replicação por parte dos ddNTPs e na eficiência da eletroforese capilar que separa os fragmentos de DNA.

Os produtos da PCR de sequenciação relativos aos fragmentos do mtDNA em estudo foram sequenciados no sequenciador automático *ABI Prism® 3130* (Applied Biosystems).

3.2.9. Análise de sequências

Os dados obtidos após sequenciação automática foram analisados no *software SeqScape® v.2.5* (Applied Biosystems), com o objetivo de averiguar a presença das variações de sequência do estudo. A sequência de referência do genoma mitocondrial humano, foi obtida na base de dados de DNA mitocondrial (MITOMAP, 2012).

3.2.10. Análise de Restrição Enzimática

A análise de restrição enzimática RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) é uma técnica que permite a deteção de variações de sequência através do uso de enzimas de restrição, nomeadamente para confirmação de alterações detetadas anteriormente por sequenciação automática.

No presente trabalho, esta análise foi usada como segundo método de confirmação e também para determinar o grau de heteroplasmia das alterações, de acordo com a descrição na Tabela 5.

Antes da restrição enzimática é efetuada uma PCR de amplificação e o sucesso da reação foi confirmado por eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

Para cada reação, foi incluído um controlo negativo (amostra de um individuo controlo que não contém essa alteração) e um branco (onde se incluiu água em vez de DNA) para a exclusão de contaminações.

Tabela 5 – Enzimas de restrição usadas para o estudo do grau de heteroplasmia das alterações.

Variação de sequência	Gene	Enzima de restrição	Sequência de restrição
m.12013A>G	*ND4*	*Cac8I* (New England BioLabs)	5'… GCN▾NGC …3' 3'… CGN▴NGC …5'
m.15246G>A	*CYB*	*Alw26I* (Fermentas)	5'… GTCTC$(N)_1$^…3' 3'… CAGAG$(N)_5$^…5'

3.2.11. Densitometria de bandas

A densidade das bandas obtidas na análise de restrição, através do *software Quantity One* 4.6.9 (Bio-Rad), usando o equipamento *ChemiDOC™* XRS (Bio-Rad), foi medida para obtenção da percentagem de heteroplasmia das alterações acima referidas.

3.2.12. Comparação de fragmentos de mtDNA com pseudogenes nucleares - Análise *in silico*

Sabendo que muitos *primers* específicos do mtDNA co-amplificam pseudogenes homólogos encontrados no genoma nuclear (Malik *et al*, 2011), foi usada uma abordagem convencional com o alinhamento BLAST® (Altschul *et al*,1990) de forma a investigar a homologia entre os pseudogenes e os genes mitocondriais de interesse.

No sentido de esclarecer se os *primers* usados poderiam estar a co-amplificar pseudogenes no DNA nuclear, foram analisadas as sequências das 8 regiões do mtDNA

de 10 controlos, escolhidos ao acaso, com o objetivo de averiguar se os nucleótidos em todas as posições variáveis descritas para os fragmentos em análise (n=320), correspondiam ao mtDNA ou a sequências de pseudogenes.

3.2.13. Cultura primária de fibroblastos

Para a realização de diagnóstico de doentes com suspeita de citopatia mitocondrial é usual realizar-se recolha de sangue. Contudo, para além disso, é importante o estudo de outro tecido para a avaliação bioquímica e molecular de CRM. O uso de fibroblastos de cultura, provenientes de biópsia de pele, tem um longo historial de utilização no estudo bioquímico de doenças mitocondriais, sobretudo pela possibilidade de armazenamento, que possibilita uma fonte renovável de DNA e re-cultura para novos testes, sem que isso represente um sofrimento adicional do doente, ou até para estudos familiares, mesmo que o doente já tenha falecido (Grazina, 2004; Rodenburg, 2011). O facto de terem a mesma origem embrionária do sistema nervoso central, constitui uma ferramenta valiosa, tendo em conta o acesso restrito a este sistema, tanto por razões éticas como funcionais, quando este se encontra afetado (Grazina, 2004).

A biópsia de pele foi realizada no hospital, em condições de anestesia local, e colocada em tubo Falcon estéril contendo solução salina Hank´s sem cálcio e magnésio (HBSS). Em seguida, procedeu-se à sua preparação para a obtenção de fibroblastos e cultura posterior, em condições de esterilidade, numa câmara de fluxo laminar, usando meio HAMF-10 (Gibco Invitrogen), 250U/ml de Penicilina e 250 µg/ml de Estreptomicina (Gibco Invitrogen), 4mM de GlutaMAX™ (Gibco Invitrogen), 250µg/ml de Kanamicina (Sigma-Aldrich), 2,5µg/ml Anfotericina B (Gibco Invitrogen), 2,5 mM piruvato de sódio (Gibco Invitrogen) e 65µg/ml de uridina (Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (Gibco Invitrogen) e 2% de Ultroser G (Gibco Invitrogen). Os frascos foram mantidos numa incubadora com as condições de humidade adequadas, a 37°C, 5% de CO_2, efetuando-se a mudança de meio aproximadamente duas vezes por semana. A uridina e o piruvato foram utilizados com o intuito de preservar as deficiências mitocondriais, no caso de elas existirem, pelo

facto de poder ocorrer o desaparecimento das mitocôndrias anormais durante o processo de replicação, uma vez que, em mitocôndrias com alterações no mtDNA, ocorre a inibição da síntese de ácidos nucleicos (Grazina, 2004).

Após atingirem a confluência desejada (Figura 7), foram tratadas com tripsina (0,05%) cerca de 4 min, centrifugadas e lavadas 2 vezes com PBS para serem usados em todos os estudos, exceto para o estudo dos níveis de proteínas por Western-blot, cujo procedimento se encontra descrito em 3.2.18.

Todas as operações envolvidas no manuseamento das células e respetivos meios foram efetuadas em condições de assepsia, com material estéril, em camara de fluxo laminar.

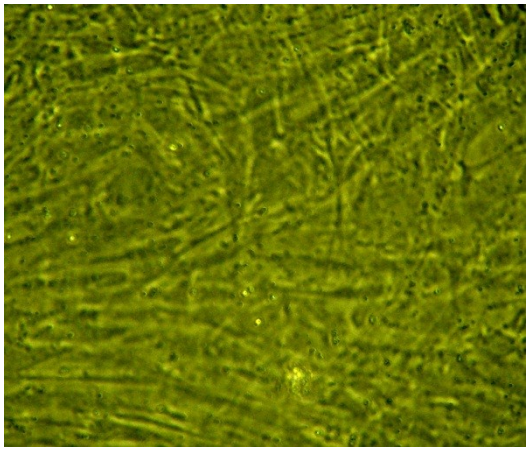

Figura 7 – Aspeto morfológico de fibroblastos humanos em cultura, derivados de biópsia de pele, com a confluência adequada.

3.2.14. Extração de RNA

Com o objetivo de verificar os níveis de transcritos dos genes em estudo, procedeu-se à extração de RNA usando o *RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN) numa *hotte* adequada para o efeito.

Os materiais utilizados foram tratados com DEPC (inibidor de RNases) para prevenir a degradação do RNA.

O sedimento de fibroblastos foi ressuspenso em 350 µl de tampão RTL (tampão de lise celular), e foram adicionados 350 µl de etanol a 70%. A mistura foi transferida para

um novo eppendorf com uma coluna com filtro de sílica, e foi submetido a lavagens sucessivas com tampão. Posteriormente, a coluna foi transferida para um novo eppendorf, com adição de 50 µl de água RNase-free e foi realizada uma última centrifugação. O RNA foi guardado a -20°C até determinação da sua concentração e integridade.

3.2.15. Quantificação e análise da qualidade/integridade do RNA

A verificação da integridade do RNA é crucial para a obtenção de resultados com a qualidade desejável.

A concentração e integridade do RNA total foi avaliada através do *Agilent RNA 6000 nano Kit* (Agilent Technologies) num sistema de eletroforese automática no aparelho *Agilent 2100 bioanalyser* (Agilent Technologies) determinando se, durante ou após a extração, ocorreu degradação de RNA.

Após desnaturação das amostras de RNA (1µl) durante 2 min a 70°C, estas foram analisadas e a leitura foi efetuada no *software 2100 Expert*, permitindo a verificação da integridade do RNA, tendo como marcadores de referência, o rRNA 18S e o 28S.

O RNA foi armazenado a -20°C, para posterior utilização.

3.2.16. Reação de Transcrição Reversa

A descoberta da enzima Transcriptase Reversa (Baltimore, 1970; Tenin and Mizutani, 1970), possibilitou a realização da sequenciação do mRNA, através da reação de síntese de DNA complementar (cDNA), permitindo identificar se uma mutação no DNA permanece no seu transcrito ou se é eliminada nessa fase.

Para sintetizar uma cadeia de cDNA, o RNA total (2µg) foi misturado com 10µl de Master Mix, 1µl de Transcriptase Reversa e água livre de nucleases para um volume total de 20µl por reação (*High Capacity RNA-to-cDNA Kit*, Applied Biosystems). Este *kit* utiliza uma combinação de oligo (dT) e *random hexamer primers* na reação de mistura. A mistura foi incubada a 37°C durante 60 min para síntese de cDNA. A Transcriptase

Reversa foi desnaturada durante 5min a 95°C, e a amostra foi guardada a -20°C, até utilização posterior.

Foi utilizado um branco (contém água em vez de RNA) para controlo de contaminação na amplificação por PCR em tempo real.

3.2.17. PCR em tempo real

Em contraste com a PCR convencional, a PCR quantitativa permite a acumulação do produto amplificado de forma a ser detetado e medido quando a reação está em progresso, isto é, em tempo real. Esta deteção é possível devido ao facto de se incluir uma molécula fluorescente na reação, que reflete um aumento na quantidade de DNA com um aumento proporcional no sinal fluorescente. Inicialmente, a fluorescência permanece no nível basal. Contudo, quando se acumula produto amplificado suficiente obtém-se um sinal de fluorescência detetável, designando-se o ciclo ao qual isso acontece, por "ciclo limiar" (C_T – *Threshold Cycle*). De acordo com as considerações experimentais deste tipo de ensaio, o sinal de fluorescência resultante da reação é proporcional à quantidade de produto amplificado na amostra.

Existem várias aplicações possíveis para esta técnica, sendo a análise de transcritos de genes a aplicação usada no presente trabalho, com o intuito de determinar o nível de expressão relativo, ao nível do mRNA, de genes contendo as variações de sequência em estudo, em amostras e controlos.

Foram usados 3 ensaios *TaqMan* (Applied Biosystems) – dois genes alvo (CYT B e ND4) e um gene de referência (Actinaβ). Os ensaios incluem uma sonda *TaqMan*, que confere a fluorescência, e primers de sequência específicos que permitiram amplificar as sequências de interesse. Para cada ensaio, foi usada uma mistura de TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) com os componentes necessários à reação (AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTPs, tampão, $MgCl_2$, …), Taq Gene (Applied Biosystems), cDNA e água *nuclease-free* até perfazer 20µl de volume total da reação.

Além do ensaio para cada gene, foi também incluído o branco sintetizado juntamente com o cDNA, para verificar se houve contaminação na reação de síntese

de cDNA e um controlo sem cDNA (*non-template control* – NTC), que permitiu verificar contaminações que pudessem ocorrer na reação da PCR em tempo real.

Usou-se um programa de 40 ciclos, com desnaturação a 95°C e *annealing* e elongação a 60°C, no sistema 7500 *Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados no 7500 *software* V.2.0.6. (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas em triplicado para um maior grau de confiança na análise.

Os níveis de expressão relativos de transcritos das amostras alvo foram obtidos através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde ΔΔCt = ΔCt (alvo) – ΔCt (controlo), tendo em conta que ΔCt (alvo) = Ct (alvo) – Ct (Actinaβ) e ΔCt (controlo) = Ct (controlo) – Ct (Actinaβ).

3.2.18. Análise de proteínas por *Western blotting*

A técnica de *Western Blot* permite detetar proteínas a partir de extratos de tecidos biológicos. Através de eletroforese em gel de poliacrilamida as proteínas desnaturadas são separadas pelo seu peso molecular e, posteriormente são transferidas para uma membrana para serem marcadas com anticorpos específicos. A quantificação dos níveis de expressão de proteínas permite verificar se existe alguma modificação na síntese de uma proteína, comparando condições diferentes na mesma amostra ou a mesma condição em amostras diferentes. Sabendo que as proteínas são biomoléculas essenciais, e que alterações nos seus níveis podem ter repercussões significativas no funcionamento dos organismos, a técnica de *Western Blot* assumiu um importante impacto na Biologia Molecular.

No sentido de diminuir as marcações inespecíficas de proteínas nucleares na quantificação dos níveis de expressão das proteínas mitocondriais em estudo, procedeu-se à preparação de frações ricas em mitocôndrias a partir dos fibroblastos em cultura.

Os fibroblastos foram lavados com meio de isolamento (250mM Sacarose (Sigma-Aldrich), 20mM HEPES (Sigma-Aldrich), 10mM KCl (Sigma-Aldrich), 1,5mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich), 1mM EDTA (Calbiochem), 1mM EGTA (Fluka)), a 4°C. De seguida, adicionou-se meio de isolamento suplementado com inibidores de proteases (0,1mM PMSF (Merck); CLAP: 1 µg/mL *chymostatin*, 1 µg/mL *leupeptin*, 1 µg/mL *antipain*,

1µg/mL *pepstatin*; Sigma-Aldrich) e com 1mM DTT (Sigma-Aldrich), a 4°C. O conteúdo celular foi homogeneizado e submetido a centrifugação (500xg), durante 12 minutos, para retirar a fração nuclear. A fração mitocondrial foi obtida por centrifugação do sobrenadante a 12,000xg, durante 20 minutos. O sedimento foi diluído em 50µl de TNC Buffer (10mM Tris acetato pH 8.0, 0.5% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich), 5mM $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich)) suplementado com os inibidores de proteases.

A proteína foi quantificada pelo Método de Bradford **(Bradford, 1976)**, a λ=595 nm, usando o espectrofotómetro *Spectramax plus 384®*, e os resultados foram obtidos através do *SoftMax Pro software.*

A amostra foi desnaturada em tampão desnaturante (300mM Tris HCl, 12% m/v SDS, 0,012% Azul de bromofenol, 600mM DTT e 60% Glicerol), a 100°C durante 5min.

As proteínas da amostra foram separadas por SDS-PAGE, em géis de poliacrilamida a 10%, transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore) em tampão CAPS (*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid)* 10mM com metanol a 10%, durante cerca de 2horas a amperagem constante (0,75A). O bloqueio das membranas foi feito com TBS (*Tris-buffered saline*) suplementado com Tween-20 a 0,1%. Os *blots* foram incubados com Anticorpos primários (*overnight* a 4°C), lavados, e expostos aos anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina (1h à temperatura ambiente). A atividade da fosfatase alcalina foi visualizada por ativação da fluorescência química com o reagente ECF (*enhanced chemifluorescence*), no sistema VersaDoc 3000 (Bio-Rad), e quantificada usando o programa *Quantity One* 4.6.9. (Bio-Rad). A proteína mitocondrial Hsp60 foi usada como normalizadora para a reação. Na tabela 4 estão listados os anticorpos usados.

Tabela 6 – Anticorpos primários e secundários usados no *Western-blotting*.

Anticorpos Primários	Diluição	Origem	Fornecedor	Anticorpos Secundários	Diluição	Fornecedor
ND4	1:200	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	Anti-Rabbit (Fosfatase Alcalina)	1:20.000	GE Healthcare
CYT B	1:200	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	Anti-Mouse (Fosfatase Alcalina)	1:20.000	GE Healthcare
Hsp60	1:1.000	Mouse	Millipore			

3.2.19. Análise dos complexos da CRM por espectrofotometria

O princípio básico da espectrofotometria é o facto de um comprimento de onda (λ) selecionado passar através da amostra, promovendo mudanças na energia de certas moléculas que absorvem a radiação emitida (visível ou ultravioleta). A atividade enzimática é obtida pela variação da absorção (densidade ótica) num certo período de tempo, determinada por um espectrofotómetro com duplo comprimento de onda (AMINCO DW 2000 UV-VIS spectrophotometer). As principais vantagens do duplo comprimento de onda incluem a redução da quantidade de amostra biológica que é necessária utilizar, a minimização de interferências causadas por alguns componentes das reações, tal como detergentes, e a grande sensibilidade do aparelho, que é de extrema importância na análise de amostras de pequena dimensão e de biopsias de tecidos como o fígado ou o coração (Grazina, 2012).

O sedimento de fibroblastos foi ressuspenso em 200 µl de PBS e a suspensão celular foi sujeita a dois ciclos de congelação-descongelação em azoto líquido, antes de iniciar os estudos espectrofotométricos, para facilitar o acesso de substratos aos complexos enzimáticos.

A determinação da atividade dos complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial incluiu a medição da atividade dos cinco complexos que catalisam a via da OXPHOS, dos dois mediadores do transporte de eletrões e da citrato sintetase (CS) - indicador da proliferação mitocondrial. A normalização dos resultados para a atividade da CS pode

permitir a minimização de diferenças de resultados uma vez que pode dar uma estimativa do número de mitocôndrias na amostra biológica. Os estudos espectrofotométricos abrangem uma série de ensaios de complexos isolados e em combinação, usando dadores e recetores de eletrões específicos. Os ensaios foram realizados a 37°C, com pH controlado (Grazina, 2012).

As condições de medição usadas foram as descritas por Grazina (2012). Considera-se que existe um défice na atividade enzimática de um complexo se esta está abaixo de 40% da média do valor controlo.

A medição da atividade do complexo I foi efetuada a λ=340-380 nm, em solução tampão, e tem início com a adição de NADH e ubiquinona (aceitador de eletrões para a oxidação de NADH) à reação, usando o inibidor do complexo I, a rotenona.

A atividade do complexo II foi medida a λ=600-750 nm, em solução tampão, com início da reação marcada pela adição de sucinato e ubiquinona. Para inibir a atividade do complexo II adiciona-se malonato e segue-se para a avaliação do complexo III, com adição de ubiquinol. De forma a inibir a atividade do complexo III foi adicionada Antimicina A.

A atividade do complexo IV foi avaliada a λ=550-540 nm, em solução tampão, com Citocromo C reduzido. Para inibir o complexo IV adicionou-se KCN.

A atividade do complexo V foi medida a λ=340-380 nm, em solução tampão. Foi adicionada oligomicina B para inibir o complexo V e garantir a especificidade na atividade.

A atividade da CS foi estimada a λ=412-600 nm, em solução tampão, usando oxaloacetato para iniciar a reação.

O conteúdo proteico foi avaliado de acordo com o método de Bradford, a λ=595 nm, usando uma curva padrão, conforme descrito na secção anterior.

3.2.20. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada, com recurso ao *software GraphPad Prism®* v. 6 (San Diego, California, USA) usando o teste *One-way ANOVA não paramétrico* - teste *Kruskal-Wallis* para análise das diferenças dos níveis de transcritos relativos entre os

doentes e controlos. O teste *Unpaired t não paramétrico* - teste *Mann-Whitney*, foi usado para análise de comparação entre dois grupos (p.e. controlo e doente). Foi assumido que a distribuição de valores não era Gaussiana, dado o número reduzido de dados disponíveis.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$.

4. Resultados

4.1 Estudo Genético de alterações no mtDNA em controlos

A análise das sequências estudadas, por sequenciação automática, das 8 regiões em estudo do mtDNA de 210 indivíduos saudáveis, comprova que as 12 alterações em estudo não estão presentes na população controlo.

Verificou-se que 10 alterações mostraram possuir caráter homoplásmico e 2 encontram-se em heteroplasmia. As Figuras 8 e 9 representam dois exemplos dos resultados obtidos na análise das sequências, através do *SeqScape*® v.2.5.

Os eletroferogramas da Figura 8 dizem respeito à alteração m.7496T>C, detetada em homoplasmia, sendo clara a presença do nucleótido C na sequência do doente 4 nos dois sentidos (5'→3' e 3'→5'), enquanto o nucleótido presente na população controlo é o T.

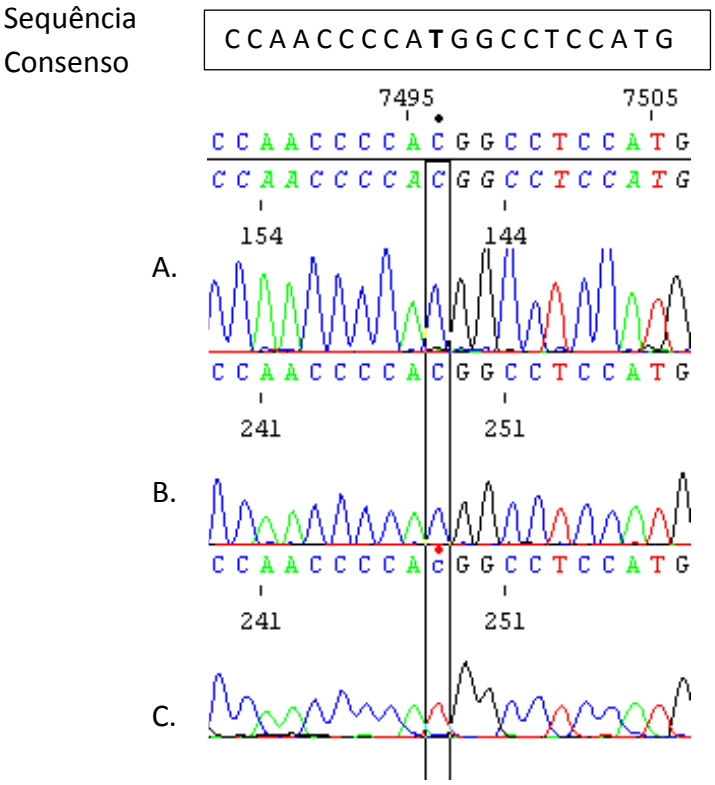

Figura 8 – Eletroferogramas relativos à deteção da alteração m.7496T>C. A – Eletroferograma no sentido *forward,* do doente 4. B – Eletroferograma no sentido reverse do doente 4. C – Eletroferograma de um controlo.

Os eletroferogramas mostrados na Figura 9 correspondem à alteração m.15246G>A, detetada em heteroplasmia no doente 3: na posição m.15246 do doente 3 existem os nucleótidos A e G, sendo o G correspondente ao *wild type*, o que significa que existe uma mistura do mtDNA mutado e *wild type,* no tipo celular estudado, para esta variação de sequência.

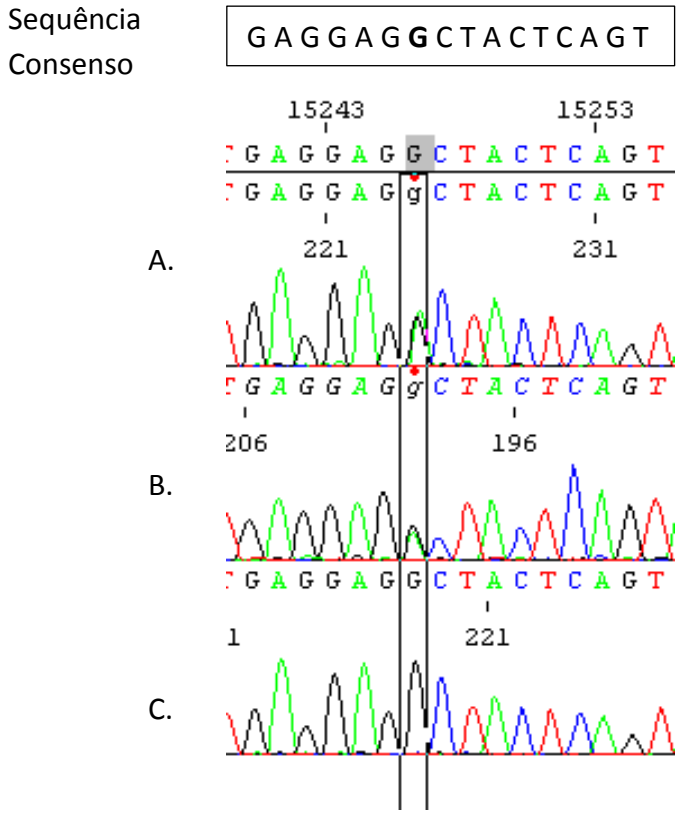

Figura 9 – Eletroferogramas relativos à deteção da alteração m.15246G>A. A – Eletroferograma no sentido *forward*, do doente 3. B – Eletroferograma no sentido reverse no doente 3. C – Eletroferograma de um controlo.

4.2 Determinação do grau de heteroplasmia

Os fragmentos dos genes de interesse foram amplificados com sucesso através da técnica da PCR, de acordo com a descrição feita no capítulo 3. O resultado das reações foi confirmado por eletroforese em gel de agarose (Figura 10 A e B) antes de prosseguir para a restrição enzimática.

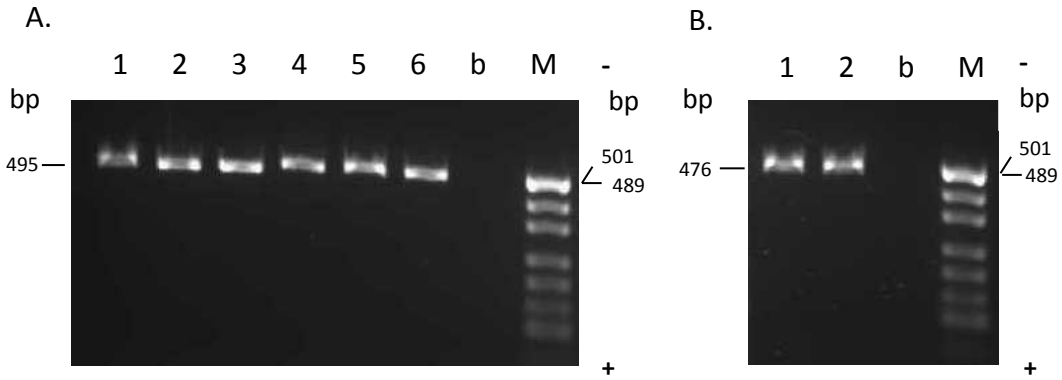

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose a 1%. Na fotografia A é possível observar as bandas relativas à amplificação do fragmento 11400-12050 a partir de amostra de DNA de sangue do doente 3 (**1**), das amostras de DNA de sangue e músculo do doente 5 (**2 e 3**, respetivamente), de amostras de DNA de linfócitos e músculo do doente 6 (**4 e 5**, respetivamente) e de amostra de DNA de linfócitos de um controlo negativo para a alteração em estudo (**6**). Na fotografia B observam-se as bandas correspondentes ao fragmento 15000-15400 a partir da amostra de DNA de linfócitos do doente 3 (**1**) e da amostra de DNA do controlo negativo para a alteração em estudo (**2**). Nas duas fotografias, assinalado com **b** está o branco que contém água em vez de amostra e com **M** o marcador de peso molecular utilizado, pUC9/ MspI 23, para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados.

No sentido de determinar o grau de heteroplasmia das alterações m.12013A>G e m.15246G>A, foi efetuada a análise de restrição enzimática (RFLP). Os resultados da eletroforese após restrição enzimática encontram-se na figura 11.

De acordo com o *software NEBcutter*® V2.0 (New England BioLabs) (Vincze *et al*, 2003), a enzima de restrição *Cac8I* forma dois fragmentos (273bp+223bp) na sequência *wild type* e três fragmentos (273bp+166bp+57bp) na sequência mutada, na posição m.12013. No caso da enzima de restrição *Alw6I,* forma dois fragmentos (243bp+233bp) quando a sequência contém uma alteração na posição m.15246 e não corta na sequência *wild type,* mantendo o fragmento original de 476bp.

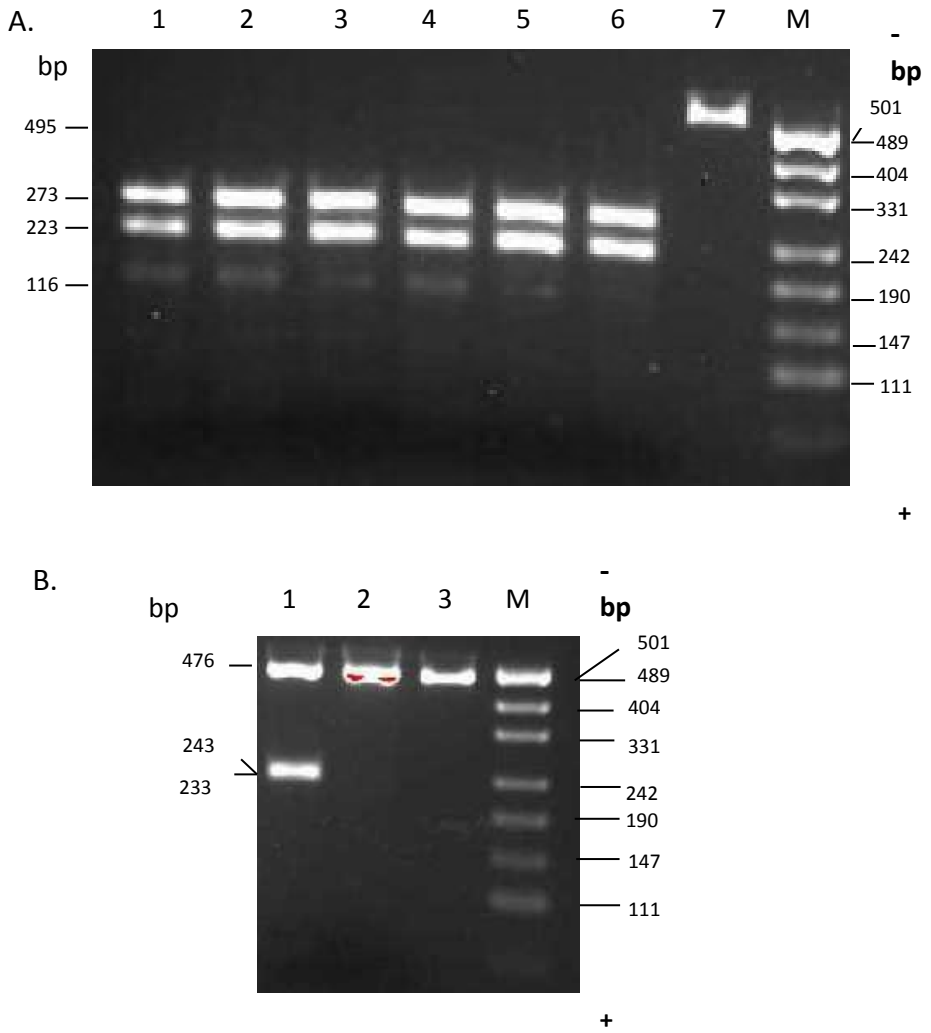

Figura 11 – Resultados da análise de restrição por PCR-RFLP. Os resultados apresentam-se em fotografia (sob radiação UV) de géis de agarose a 3%, corados com brometo de etídeo. **A –** Fotografia em que se visualizam os fragmentos de DNA resultantes da PCR-RFLP para a alteração heteroplásmica m.12013A>G, detetada nos doentes 3, 5 e 6**.** Posições de migração do gel: **1 –** amostra de DNA de linfócitos do doente 3 após digestão enzimática; **2 e 3 –** amostras do doente 5 (linfócitos e músculo, respetivamente) com alteração; **4 e 5 –** amostras digeridas do doente 6 (DNA de linfócitos e músculo, respetivamente) com alteração; **6 –** amostra digerida do controlo negativo para a alteração correspondente à variante *wild type*; **7 –** fragmento não sujeito a restrição enzimática; **M –** marcador pUC9/ mspI 23. **B –** Fotografia em que se visualizam os fragmentos de DNA resultantes da PCR-RFLP para a alteração heteroplásmica m.15246G>A detetada no doente 3**.** Posições de migração do gel: **1 –** amostra de DNA de linfócitos, após restrição enzimática; **2 –** amostra digerida do controlo negativo para a alteração correspondente à variante *wild type*; **3 –** fragmento não sujeito a restrição enzimática; **M –** marcador pUC9/ mspI 23.

A fotografia 11A confirma que a alteração m.12013A>G, se encontra em heteroplasmia nas amostras dos doentes 3, 5 e 6, em DNA de linfócitos (posição 1,2 e 4), uma vez que estão presentes os fragmentos 273bp, 223bp e 166bp, o que demonstra a presença do fragmento de mtDNA amplificado numa mistura de *wild type* e mutante.

A fotografia 11B confirma a heteroplasmia para a alteração m.15246G>A apresentada pelo doente 3 em linfócitos, tendo sido identificada a banda correspondente aos fragmentos 243bp e 233bp.

A análise por densitometria de bandas permitiu estimar o grau de heteroplasmia da alteração m.12013A>G em cada doente e tecido estudado, e da alteração m.15246G>A em DNA de linfócitos no doente 3. De acordo com os dados da tabela 7, tanto no doente 5 como no doente 6, a percentagem de heteroplasmia da alteração m.12013A>G é mais baixa no músculo (9,6% e 7,3%, respetivamente) do que nos linfócitos (19,2% e 16,4%, respetivamente). Além disso, a percentagem de heteroplasmia no DNA dos linfócitos dos três doentes não é muito variável.

Tabela 7 – Percentagem de heteroplasmia das alterações de sequência

Variação de sequência	Doente 3 (linfócitos)	Doente 5 (Linfócitos/Musculo)	Doente 6 (Linfócitos/Musculo)
m.12013A>G	15,8%	19,2% / 9,6%	16,4% / 7,3%
m.15246G>A	14,4%	__	__

4.3 Comparação de fragmentos de mtDNA com pseudogenes nucleares

De acordo com alinhamento BLAST® (Altschul *et al*,1990), verificou-se que existem fragmentos de DNA nuclear homólogos para o mtDNA de 7 das 8 regiões em estudo.

Comparando as sequências dos fragmentos nucleares homólogos e as sequências do mtDNA que se espera amplificar, não se encontra total correspondência, logo quando comparadas as diferenças entre as sequências dos fragmentos de DNA nuclear (pseudogenes) dadas pelo BLAST® e as sequências de DNA mitocondrial dos 10

controlos amplificadas pelos *primers* do presente estudo, verificou-se que nas posições as sequências amplificadas correspondiam ao genoma mitocondrial humano.

4.4 Estudos em fibroblastos de cultura

Todos os estudos realizados nesta secção dizem respeito à analise da alteração m.14771C>A, detetada no doente 12, tendo sido realizado o mesmo procedimento em células de dois indivíduos saudáveis (controlos negativos 1 e 2) e de um indivíduo com uma mutação descrita como patogénica (m.11778G>A) associada a LHON (mutante m.11778G>A).

4.4.1 Confirmação da presença das alterações do mtDNA em estudo

Após extração de DNA de fibroblastos em cultura, foi confirmada a presença da mutação m.11778G>A nos fibroblastos do mutante m.11778G>A, e a sua ausência no doente 12 e nos controlos negativos (figura 12). A presença da variação de sequência m.14771C>A nos fibroblastos do doente 12 (figura 13), foi confirmada através de sequenciação automática, estando ausente nos controlos negativos.

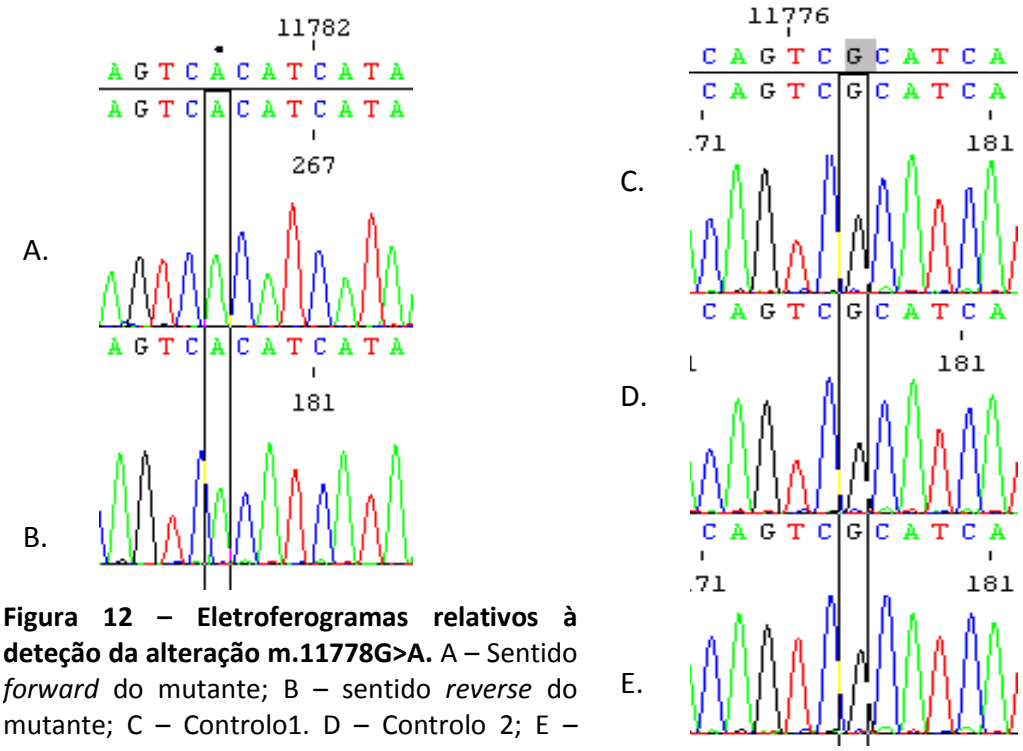

Figura 12 – Eletroferogramas relativos à deteção da alteração m.11778G>A. A – Sentido *forward* do mutante; B – sentido *reverse* do mutante; C – Controlo1. D – Controlo 2; E – Doente 12.

A sequenciação no sentido *reverse* foi efetuada apenas quando se pretendeu confirmar a presença das alterações detetadas no sentido *forward*.

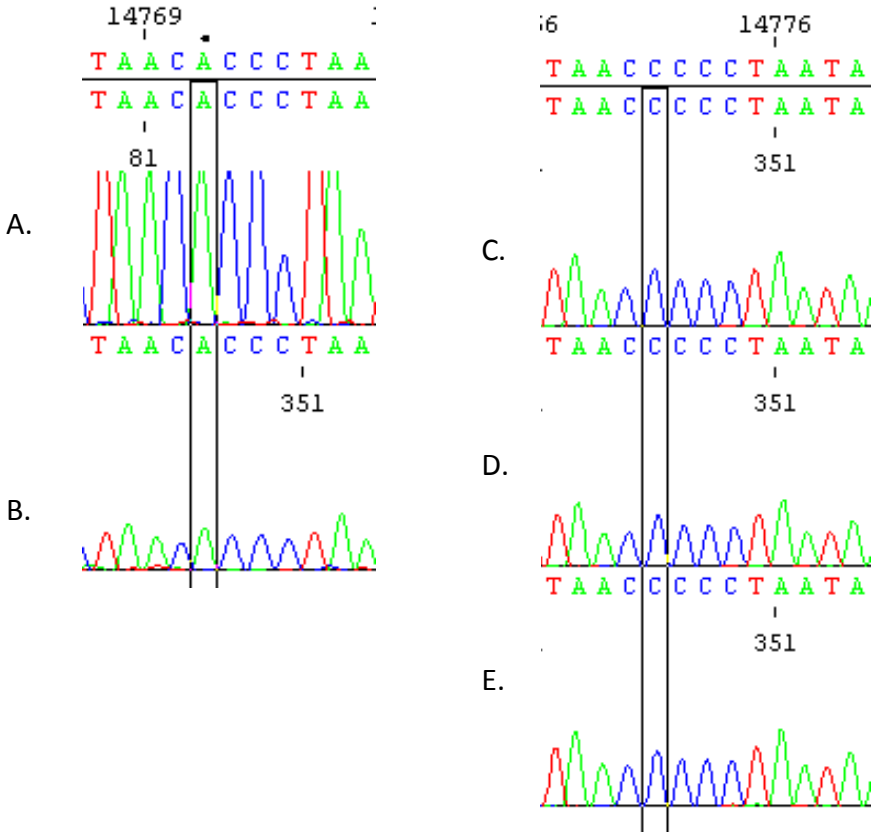

Figura 13 – Eletroferogramas relativos à deteção da alteração m.14771C>A. A – Sentido *forward* no doente 12; B – sentido *reverse* no doente 12; C – Controlo 1; D – Controlo 2; E – Mutante m.11778G>A.

4.4.2 Confirmação da presença das alterações em estudo no mRNA

Após a extração de RNA, foi realizada a análise da integridade do RNA, que mostrou que os valores de RIN (*RNA Integrity Number*) obtidos eram muito próximos do valor máximo, isto é, próximo de 10 valores (Figura 14). Além disso, também o quociente [28S/18S] rRNA se apresentou entre o intervalo apropriado demonstrando que o RNA tinha um bom grau de pureza e qualidade adequada para análise, não estando degradado.

Estes dados indicam-nos que durante a extração e manuseamento do RNA, este se manteve integro e em condições adequadas à sua análise posterior.

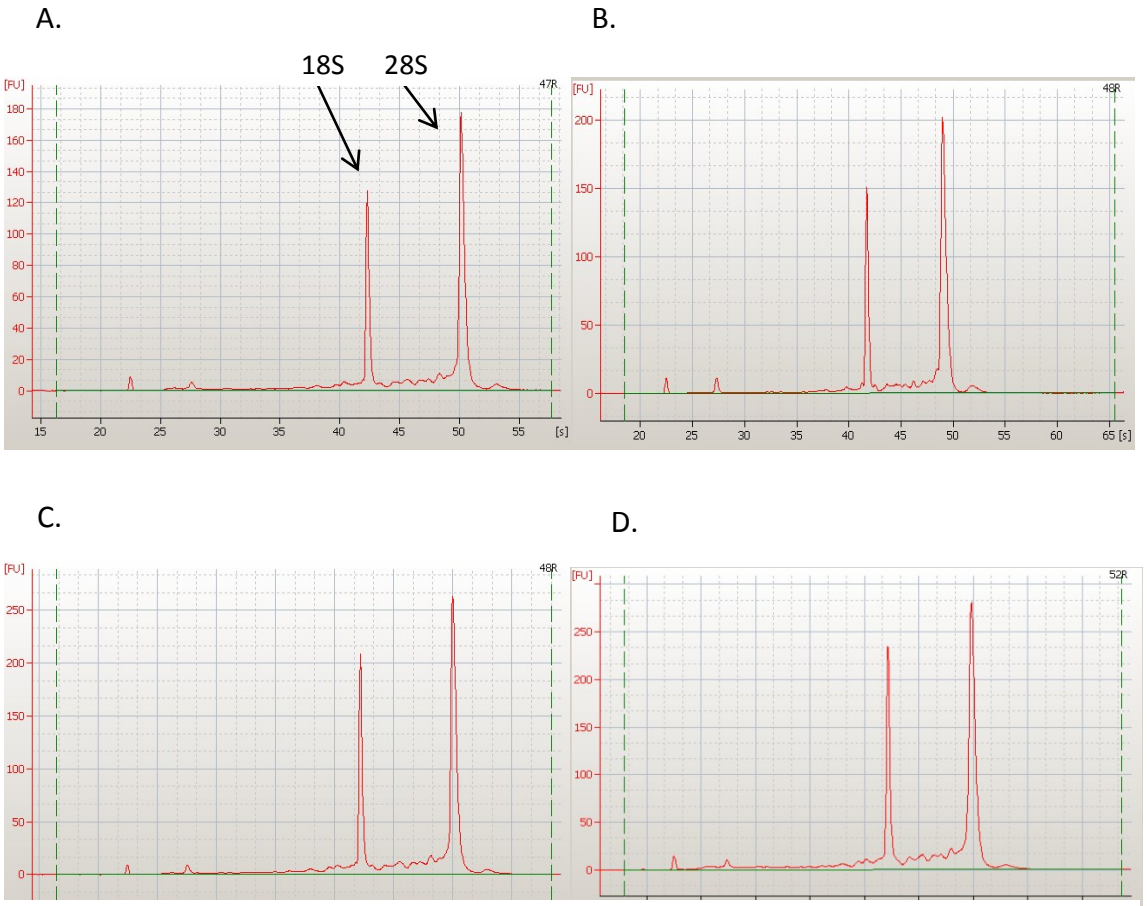

Figura 14 – Análise da integridade do RNA. A – Amostra do controlo positivo (RIN – 9,4); B – Amostra do doente 12 (RIN – 9,9); C – Controlo 1 (RIN – 9,2); D – Controlo 2 (RIN – 9,2).

No sentido de verificar se as variações de sequência em estudo permanecem após a transcrição, procedeu-se à extração de RNA e foi sintetizado cDNA, que foi posteriormente sequenciado.

Sabendo que os controlos negativos não possuíam as alterações no DNA, apenas foi sequenciado cDNA do mutante m.11778G>A e do doente 12, para deteção das alterações m.11778G>A (figura 15 A) e m.14771C>A (Figura 15 B), respetivamente, ao nível do mRNA.

De acordo com os resultados obtidos, a alteração m.11778G>A foi detetada no cDNA mitocondrial do mutante m.11778G>A e a alteração m.14771C>A estava presente no cDNA mitocondrial do doente 12.

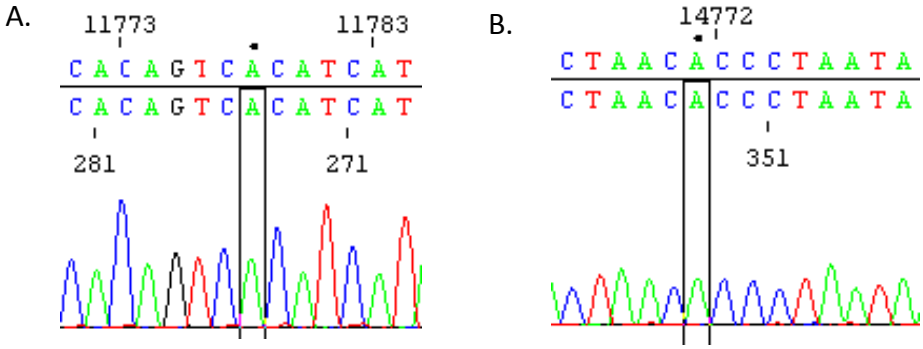

Figura 15 – Eletroferogramas relativos à deteção das alterações m.11778G>A e m.14771C>A, no cDNA. A – mutante m.11778G>A; B – doente 12.

4.4.3 Análise da atividade dos complexos da CRM

Tendo em conta a importância da relação genótipo-fenótipo bioquímico, torna-se imprescindível analisar a atividade de cada complexo da CRM, uma vez que uma alteração pode alterar a função da proteína, sem que os seus níveis de expressão se encontrem alterados. Desta forma, foram realizados estudos espectrofotométricos para avaliar a atividade de cada complexo e os valores foram normalizados para a CS.

Conforme mencionado na secção, considera-se que existe um défice na atividade de um complexo quando esta está abaixo de 40%, da média do valor controlo.

A Figura 16 apresenta graficamente a atividade enzimática de cada complexo, no doente 12. Os resultados obtidos para todos os complexos estão apresentados na Tabela 8.

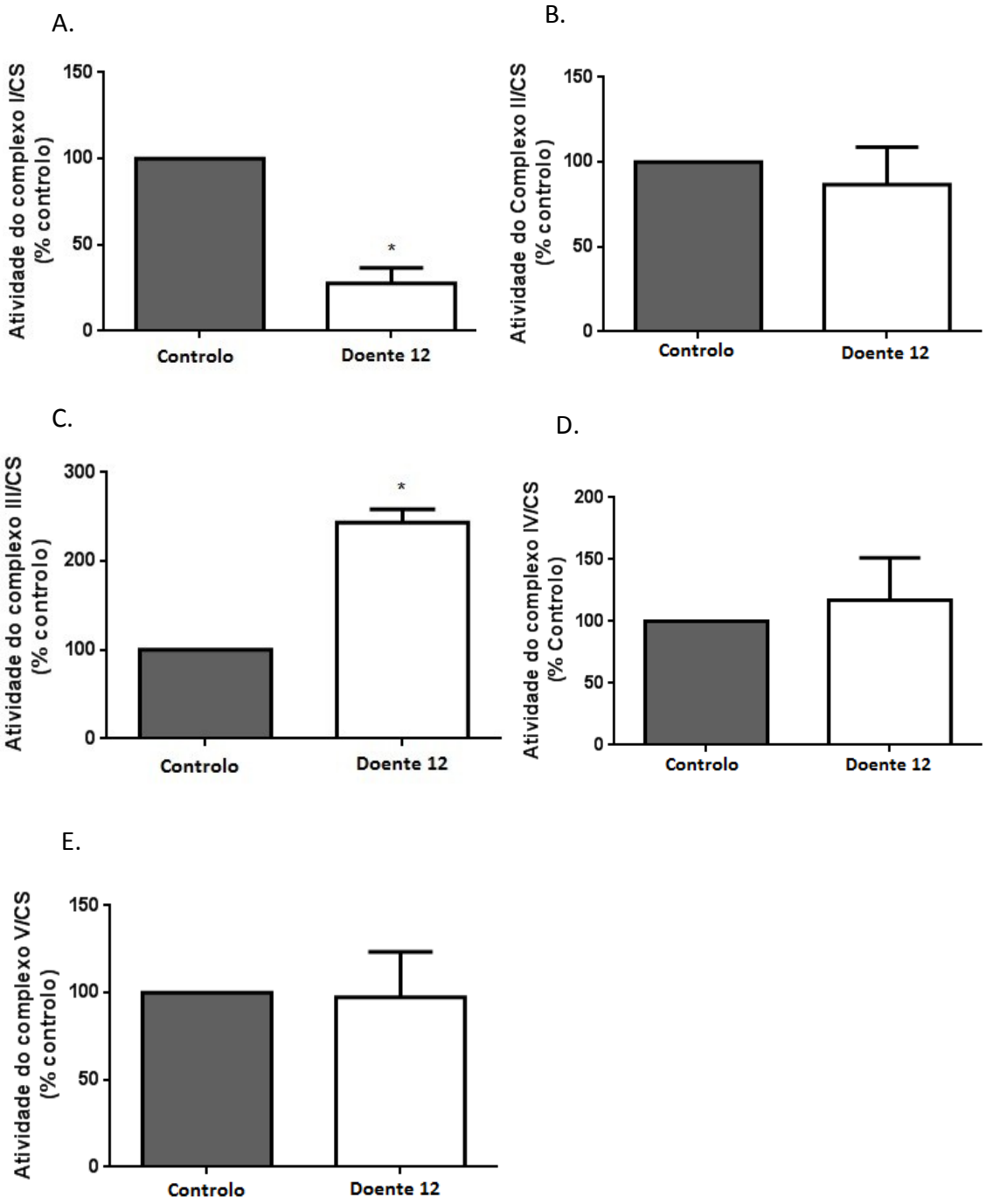

Figura 16 – Atividade enzimática dos complexos da CRM, no doente 12. A – Atividade do complexo I; B – Atividade do complexo II; C – Atividade do complexo III; D – Atividade do complexo IV; E – Atividade do complexo V; Os resultados representam a quantificação de dois procedimentos independentes, um deles em duplicado (n=3), e estão expressos em relação à percentagem do controlo. (média ± SEM). Análise estatística com o teste *Unpaired t*, seguido do teste *Mann-Whitney*, p= 0,0238(A) e p=0,0238 (C).

Tabela 8 – Resultados da medição da atividade dos complexos da CRM, normalizados para a Citrato Sintetase, em relação ao valor controlo.

Complexos	I/CS	II/CS	III/CS	IV/CS	V/CS
Mutante m.11778G>A	95%	167%	62%	n.d.	96%
Doente 12	39%	87%	178%	117%	98%

Legenda: n.d.= não determinado (devido a limitação de material).

De acordo com os resultados obtidos, não se verificou redução significativa na atividade do complexo I da CRM, no mutante m.11778G>A, relativamente ao controlo. O doente 12 apresenta um défice na atividade do complexo I (Figura 16A) e um aumento na atividade enzimática do complexo III da CRM (Figura 16C), estatisticamente significativo (p=0,0238 e p= 0,0238 respetivamente).

4.4.4 Analise dos níveis dos transcritos

Os níveis dos transcritos dos genes *MT-ND4* e *MT-CYB* foram determinad0s por qRT-PCR.

Verificámos que os níveis de expressão relativa do transcrito dos dois genes analisados (*MT-CYB* e *MT-ND4)* (Figura 17 e 18, respetivamente), apresentam uma diminuição estatisticamente significativa (p=0,0036 e p=0,0107, respetivamente) no doente 12.

No mutante m.11778G>A, os níveis dos transcritos, em estudo, não estão significativamente diferentes comparativamente ao controlo, embora se verifique uma ligeira diminuição (82%) para o gene ND4.

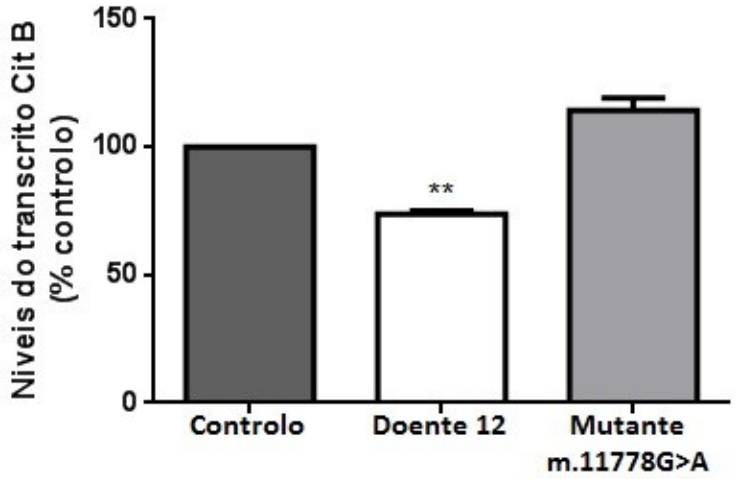

Figura 17 – Níveis do transcrito do gene *MT-CYB*, considerando o valor controlo como 100%. Os resultados representam a quantificação de um procedimento realizado em triplicado (n=3), e estão expressos em relação à percentagem (média ± SEM) do controlo. Análise estatística com o teste *One-way ANOVA, Kruskal-Wallis*, p=0,0036.

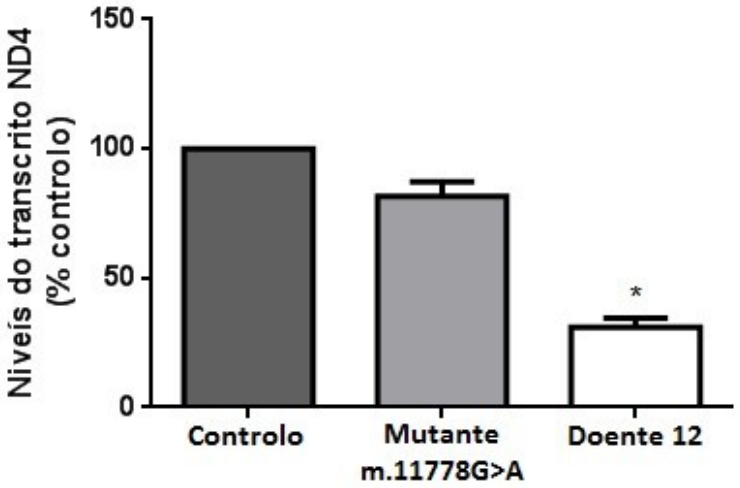

Figura 18 – Níveis do transcrito do gene *MT-ND4*, considerando o valor controlo como 100%. Os resultados representam a quantificação de um procedimento realizado em triplicado (n=3), e estão expressos em relação à percentagem (média ± SEM) do controlo. Análise estatística com o teste *One-way ANOVA, Kruskal-Wallis*, p=0,0107.

4.4.5 Quantificação relativa das proteínas Cit B e ND4

Sabendo que mutações no mtDNA podem alterar a síntese proteica mitocondrial, foram avaliados os níveis das proteínas codificadas pelos genes mutados, por Western blotting. A quantificação dos níveis de cada proteína (Cit B e ND4) foi normalizada para a proteína mitocondrial Hsp60.

De acordo com os resultados obtidos, não se verificou uma diminuição estatisticamente significativa dos níveis da proteína codificada pelo gene *MT-CYB,* no doente 12 (Figura 19)

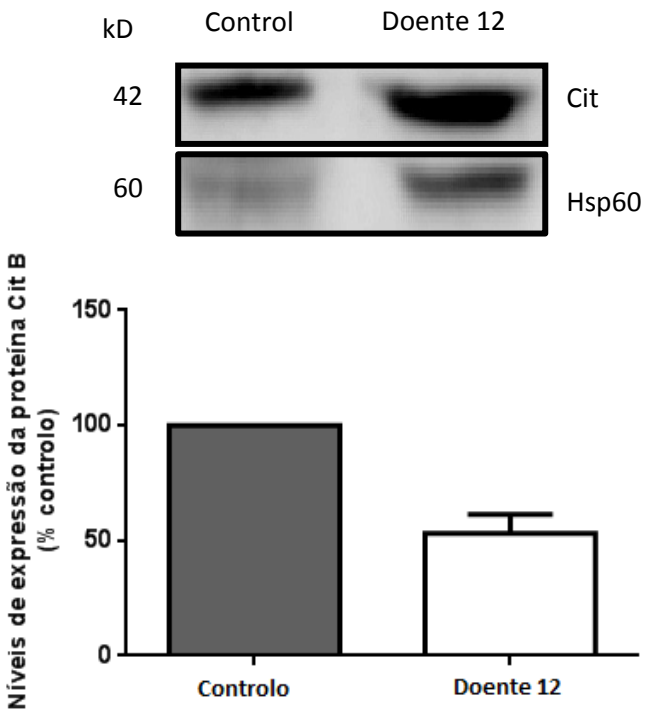

Figura 19 – Análise dos níveis de expressão da proteína Citocromo B. Os resultados representam a quantificação de dois procedimentos independentes (n=2)e estão expressos em relação à percentagem do controlo. (média ± SEM). Análise estatística com o teste *Unpaired t*, seguido do teste *Mann-Whitney*.

Quando comparamos os níveis de proteína ND4 do mutante m.11778G>A e do doente 12, relativamente ao valor controlo, verifica-se um aumento dos níveis de proteína ND4 no primeiro e uma diminuição no segundo. Contudo, estas alterações não são estatisticamente significativas (Figura 20).

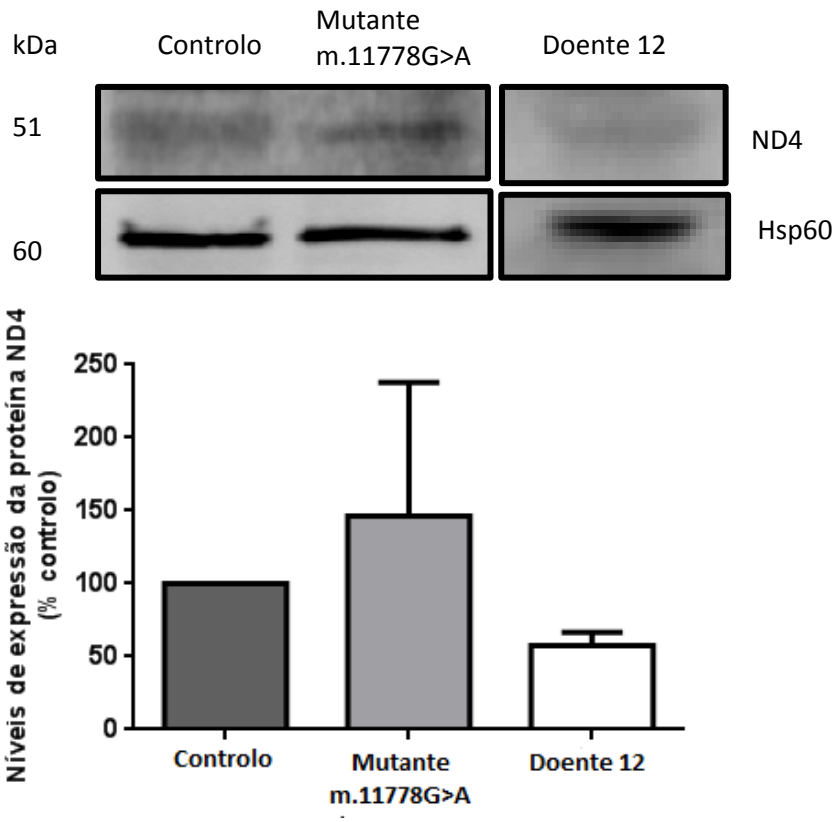

Figura 20 – Análise dos níveis de expressão da proteína ND4. Os resultados representam a quantificação de dois procedimentos independentes (n=2) e estão expressos em relação à percentagem do controlo. (média ± SEM). Análise estatística com o teste *One-way ANOVA*, seguido do teste *Krustal-Wallis*.

5. Discussão

5.1. Estudo Genético de alterações no mtDNA

Nas citopatias mitocondriais, pelo facto de serem doenças heterogéneas, é difícil a associação do genótipo-fenótipo clínico dos doentes, o que dificulta grandemente o diagnóstico. No caso dos doentes do presente estudo, a informação clínica não é suficiente para elucidar qual a patologia específica associada, uma vez que a maioria dos doentes tem uma sintomatologia muito geral, associada a um défice na síntese de ATP. Embora haja casos onde há uma forte suspeita de uma determinada patologia, o resultado negativo do rastreio para as mutações patogénicas primárias para essa doença levam a um diagnóstico genético indefinido.

Uma interpretação correta da possível patogenicidade de variações de sequência novas encontradas no mtDNA é essencial para elucidar o seu significado como causa das manifestações clínicas apresentadas pelo doente. Assim, é importante e necessário ter um guia prático e uniforme para a interpretação de variantes no genoma mitocondrial, de forma a existir maior consenso no diagnóstico entre laboratórios (Wang *et al*, 2012). Nesse sentido, surgiram os critérios de patogenicidade para avaliação do impacto de variações de sequência novas no mtDNA (Wong, 2007; Yarham *et al*, 2011).

Quando nos focamos nos critérios de patogenicidade, torna-se evidente a importância de estudos para averiguar o impacto de uma variação de sequência na funcionalidade da molécula mutada. Contudo, os estudos funcionais exigem tempo e têm custos elevados, o que torna impossível a realização destes para todas as alterações novas encontradas no mtDNA. Na atualidade, as ferramentas bioinformáticas são muito úteis na análise do impacto duma variação de sequência na estrutura, função e conservação evolutiva dos genes/proteínas, que são uma pista importante para determinar a patogenicidade de uma variação de sequência nova, ou rara, no mtDNA (Wang *et al*, 2012). Tendo em conta estes factos, a investigação da patogenicidade das alterações no presente estudo baseou-se na análise *in silico* realizada previamente.

Um ponto fulcral a investigar, antes da realização de estudos experimentais, é o facto de, além de todas as características particulares deste genoma, já descritas, ocorrer o fenómeno de integração de mtDNA no DNA nuclear conforme descrito para

muitos genomas eucariotas. Um “pseudogene” é uma cópia não funcional de um gene normal, que tem sido ligeiramente alterado; de tal forma, que deixou de ser expresso. Os pseudogenes são similares, mas não idênticos, aos genes homólogos; variam em tamanho e estão distribuídos de forma aleatória pelos cromossomas (Tourmen *et al*, 2002). Uma co-amplificação fortuita de cópias nucleares de genes mitocondriais pode dificultar a determinação dos níveis de heteroplasmia e a identificação de mutações no mtDNA (Parfait *et al*, 1998). Esta particularidade conduziu-nos à necessidade de confirmar que os genes amplificados dizem respeito a genes mitocondriais, apesar da especificidade dos *primers* usados. Contudo, a abordagem usada, indica-nos que estamos a amplificar DNA mitocondrial e que as alterações encontradas estão no genoma mitocondrial e não em pseudogenes nucleares.

Após a seleção das variações de sequência novas no mtDNA, com potencial patogenicidade, e da confirmação da amplificação dos genes mitocondriais, a confirmação da ausência dessas alterações em indivíduos saudáveis foi o passo seguinte. Foi realizado o rastreio das 8 regiões do mtDNA contendo a maior parte das mutações patogénicas em controlos, o que é também um indicador importante na avaliação da patogenicidade das alterações, uma vez que a sua ausência em indivíduos saudáveis, aumenta a probabilidade destas serem patogénicas (Montoya *et al.,* 2009). Contudo, na literatura não existe consenso do número de controlos a usar neste tipo de estudos, e o rastreio de indivíduos saudáveis acarreta custos elevados e tempo. Assim, tendo em conta vários estudos publicados, a ausência destas alterações nos 210 indivíduos saudáveis sugere a sua potencial patogenicidade, uma vez que os controlos foram selecionados aleatoriamente e, portanto, são uma amostra representativa da população portuguesa. No sentido de expandir o estudo à população mundial, a solução para evitar as discrepâncias no número de controlos usados, entre os laboratórios, seria gerar um depósito de sequências numa base de dados, de livre acesso, para verificar a alteração pretendida, reduzindo assim os custos e o tempo usados na análise experimental.

A progressão das doenças mitocondriais em doentes com variações de sequência no mtDNA é refletida, na maioria dos casos, por um aumento da proporção de mtDNA mutado. A distribuição do mtDNA mutado nos tecidos de um indivíduo é muito variável, embora os níveis mais elevados de mtDNA mutado sejam normalmente

encontrados no músculo-esquelético e cérebro, devido à natureza pós-mitótica desses tecidos, que promove a acumulação de células com mtDNA mutado (Weber *et al*, 1997). Nas duas alterações novas, m.12013A>G e m.15246G>A, detetadas previamente no LBG em heteroplasmia, por sequenciação automática e confirmada por PCR-RFLP, verificou-se que a percentagem de cópias de mtDNA mutadas é baixa (7,3-19,2% e 14,4%, respetivamente) sendo a quantidade de cópias normais superior à quantidade de cópias mutadas. Quando esta situação se verifica, o número de cópias normais poderá compensar o efeito prejudicial da mutação num tecido. Apesar disso, no presente estudo, o facto de possuírem uma percentagem de heteroplasmia reduzida, não exclui a possibilidade das duas alterações referidas possuírem um caráter patogénico. De facto, se uma alteração for altamente prejudicial, um pequeno número de cópias de mtDNA mutado é suficiente para induzir alterações no organismo, uma vez que o efeito limiar varia com a mutação e o tecido (Montoya, *et al*., 2009; Yarham *et al*, 2011). Além da baixa percentagem de heteroplasmia, foi observado que a alteração m.12013A>G, nos dois doentes em que foi realizada a análise de restrição enzimática para linfócitos e músculo, apresentou um grau de heteroplasmia inferior no músculo relativamente aos linfócitos. Embora na literatura não haja referência a nenhum caso semelhante, o facto de esta situação ter sido identificada em 2 doentes não aparentados é um forte indício de que poderá ser patogénica. Por ser uma exceção à regra, terá de ser realizada uma investigação mais aprofundada para compreender a razão deste facto.

Habitualmente, as mutações patogénicas no mtDNA são heteroplásmicas e os polimorfismos neutros são homoplásmicos. Todavia, têm sido encontradas muitas exceções e tem aumentado o número de mutações homoplásmicas descritas como patogénicas (DiMauro and Davidzon, 2005). Nesse sentido, no que diz respeito às restantes dez alterações em estudo, a deteção em homoplasmia não exclui a possibilidade de serem patogénicas, embora seja atribuída uma pontuação mais elevada nos critérios de patogenicidade quando a alteração está em heteroplasmia. Além disso, o método de sequenciação automática poderá não permitir detetar uma percentagem baixa (<5%) de cópias de outra variante de mtDNA, e níveis de heteroplasmia acima de 95% poderiam ser interpretados como homoplasmia, com esta metodologia (Wang *et al*, 2012). Para determinar com precisão se as alterações

em estudo estão em homoplasmia ou se apresentam com elevado grau de heteroplasmia, um método de grande sensibilidade como a *Next-generation sequencing* poderá vir complementar os resultados obtidos por sequenciação automática (Wang *et al*, 2012).

Outro parâmetro com destaque na atribuição da patogenicidade, é o facto de a mutação ser detetada em mais que um doente ou família. Contudo, quase todas as mutações são únicas de uma família ou indivíduo, sendo extremamente raro encontrar a mesma mutação patogénica nova em mais que um indivíduo (Montoya *et al*, 2009), exceto em alguns casos. Deste modo, no presente trabalho apenas a alteração m.12013A>G foi encontrada em 3 doentes, sendo que todas as outras foram detetadas em apenas um doente, até à presente data.

5.2. Estudos em fibroblastos em cultura

No que diz respeito ao estudo funcional, foram usados fibroblastos em cultura, devido ao seu caráter menos invasivo na colheita, quando comparado com a biópsia muscular (de Paepe *et al*, 2006), uma vez que, em geral, os doentes em estudo são crianças. Por outro lado, a possibilidade de manter as células em cultura para estudos futuros sem incomodo adicional para os doentes, é uma mais valia.

A mutação m.11778G>A, presente no mutante m.11778G>A, está descrita com uma pontuação de 37 pontos em 40, na atribuição da sua patogenicidade (Wong, 2007). Esta alteração provoca a substituição do aminoácido arginina, conservado evolutivamente, pelo o aminoácido histidina, na posição 340 da subunidade ND4 do complexo I. Esta substituição de aminoácido altera a afinidade do complexo I para o substrato ubiquinona e induz resistência à inibição por a rotenona, em mitocôndrias de doentes com LHON (Degli Esposti *et al*, 1994).

Nos resultados obtidos no presente trabalho, não foi detetado um défice na atividade enzimática do complexo I, como seria de esperar, dado ter sido identificada a mutação patogénica em homoplasmia. Esta doente teve a idade de início da doença aos 8 meses, com alterações da visão. Com o avanço da idade, foi apresentando sintomas neurológicos graves e atrofia ótica. A atividade enzimática dos complexos da

CRM, em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético, apresentou-se normal aos 3 anos de idade, quando foi detetada a mutação m.11778G>A em músculo, fibroblastos e linfócitos (Grazina *et al*, 2007). Contudo, estudos bioquímicos mais recentes (12 anos de idade), em músculo, demonstraram um défice significativo da atividade enzimática do complexo I (38,2%), acompanhado pela progressão do fenótipo, que se estendeu ao sistema locomotor (Grazina *et al*, 2007). Este efeito pode ser causado pela acumulação de moléculas de mtDNA mutadas nos tecidos mais afetados, excedendo o efeito limiar. Sabendo que os fibroblastos desta doente, usados no presente trabalho, foram criopreservados desde a primeira biópsia (aos 3 anos de idade) a explicação mais provável para a atividade do complexo I da CRM ser normal, terá a ver com o facto de, numa fase mais inicial da doença poder ter ocorrido um efeito compensatório do aumento da transcrição e tradução, "mascarando" o défice, não sendo atingido o efeito limiar (Rossingnol *et al*, 2003).

Para além disso, o nosso estudo foi efetuado em fibroblastos em cultura, e embora este tipo celular tenha inúmeras vantagens, a análise bioquímica do complexo I, nestas células, apresenta uma alta taxa de falsos-negativos e como se sabe, défices na CRM expressos em músculo podem não ser expressos em fibroblastos (Haas *et al*, 2008). Assim, uma ausência de défices no estudo enzimático em fibroblastos não exclui a possibilidade de doença metabólica mitocondrial (Haas *et al*, 2008).

Além do que já se sabe para esta mutação, o estudo dos níveis do transcrito do gene *MT-ND4* e da proteína ND4, associados à mutação m.11778G>A, não manifestaram alterações significativas, no presente trabalho. Assim, podemos colocar duas hipóteses: por um lado, esta mutação patogénica poderá não ter um efeito significativo nos níveis de transcrito e proteína, atuando principalmente na função enzimática do complexo I, apesar dos nossos resultados não terem sido nesse sentido. Por outro lado, na altura da biópsia de pele, poderia subsistir um efeito compensatório, por parte das células, na transcrição e síntese de proteína, para que atividade do complexo I se mantenha normal, não sendo percetível qualquer alteração a nível quantitativo e funcional. No sentido de elucidar esta questão, seria necessário realizar uma nova biópsia de pele e efetuar os estudos funcionais em fibroblastos desta nova amostra.

Verificámos ainda que há uma ligeira diminuição da atividade enzimática de outro complexo da CRM (complexo III). Têm sido descritos efeitos de sinergia entre a mutação patogénica m.11778G>A e alterações em outros genes mitocondriais (Zhang *et al*, 2011; Qian *et al*, 2011). Apesar dos níveis de transcritos do gene *MT-CYB* aparentarem estar ligeiramente diminuídos (Figura 17), parece não ter consequências funcionais, uma vez que, os níveis de proteína Cit B parecem estar normais (sem significado estatístico).Contudo, os nossos resultados são preliminares, dado o número de experiencias realizadas e são necessários mais estudos para confirmar os dados obtidos até ao momento. Apesar disso, sabe-se que esta mutação, descrita como patogénica associada a LHON, promove disfunção da CRM, devido a uma diminuição significativa da atividade do complexo I, e portanto, pode ser considerado um controlo positivo para este trabalho.

Quando se estuda o impacto de uma variação de sequência nova no mtDNA, como é o caso da m.14771C>A no *MT-CYB*, há vários parâmetros a analisar, de que falaremos em seguida.

De acordo com os critérios de patogenicidade, acima mencionados, aplicados às alterações de sequência descritas como patogénicas, o gene *MT-CYB*, pertencente ao complexo III, tem a maior taxa de mutações por Kilobase, quando comparado com os genes do complexo I, IV e V (Wong, 2007). Além disso, a subunidade Cit B do complexo III é a segunda com a conservação evolutiva proteica mais alta, sugerindo que mutações neste gene são menos toleradas (Wong, 2007).

No que diz respeito à avaliação do impacto dessas alterações nos transcritos, mutações nos codões iniciais e de terminação têm sido encontradas associadas a alterações nos níveis de transcritos (Wong, 2007). Sabendo que a alteração m.14771C>A é localizada no codão 9 do *MT-CYB*, podemos assumir que o transcrito deste gene estará a ser afetado por ter a mutação num local que confere estabilidade ao mRNA. Além disso, também o domínio proteico afetado e a substituição de um aminoácido por outro com propriedades muito diferentes, influenciam o impacto da alteração. Contudo, a função de muitas subunidades codificadas pelo mtDNA e domínios proteicos continuam por estabelecer (Montoya *et al*., 2009). Esta variação de sequência resulta da substituição de uma Citosina por uma Adenina, sugerindo que pode ter resultado de danos oxidativos (Mahjoub *et al*, 2012).

As sequências de aminoácidos na região do *N*-terminal na maioria dos casos não é altamente conservada. Sabendo que a alteração é no aminoácido 9 da proteína, podemos constatar através da estrutura que a alteração se encontra na região *N*-terminal (Fisher and Meunier, 2001). No entanto, a análise *in silico* da conservação evolutiva da sequência proteica do Cit B aponta para um alto grau de conservação até na região *N*-terminal, especialmente na posição em estudo, que detém 100% de conservação evolutiva no nucleótido e aminoácido, indicando a importância funcional deste resíduo. Em geral, existe uma grande diferença entre as propriedades químicas de dois aminoácidos, aumentando a probabilidade da alteração ser patogénica quando há alteração do aminoácido com a mutação. A polaridade e o tamanho de cada aminoácido são as propriedades mais frequentemente usadas nestes estudos (Montoya *et al*., 2009). No caso da transversão m.14771C>A no gene *MT-CYB*, esta provoca a alteração proteica p.P9T, ou seja, o aminoácido prolina é alterado para o treonina.

Segundo a análise *in silico*, esta alteração obtém uma pontuação de 0,996, no Polyphen-2® (Adzhubei *et a*l, 2010) onde a pontuação máxima é 1, e uma pontuação de 0, no SIFT® (Kumar *et al*, 2009), onde a pontuação máxima de patogenicidade é 0. Este resultado não é surpreendente, se tivermos em conta que a prolina é um aminoácido apolar ou hidrofóbico e o mais rígido de todos os aminoácidos, devido à sua estrutura tridimensional muito particular, que influencia acentuadamente a "arquitetura" das proteínas. A sua substituição pela treonina, um aminoácido polar ou hidrofílico, no *N*-terminal de uma proteína integral na membrana, pode dar origem a uma alteração na sua estrutura tridimensional, levando a um aumento da sua instabilidade na membrana, o que pode ter graves consequências a nível funcional. Por outro lado, sabe-se que a sequência de aminoácidos do terminal amínico das proteínas controla o destino ou o processamento da proteína, sendo que uma proteína membranar tem um trecho de 20 aminoácidos hidrofóbicos que servem como sinal para endereçar a proteína para a membrana apropriada. Deste modo, é praticamente inevitável que esta alteração de sequência não provoque mudanças a nível estrutural e funcional, apesar do resultado obtido para a quantificação do Cit B (Figura 19) não mostrar um valor significativamente diminuído em relação aos controlos, o que pode dever-se ao número reduzido de experiências.

A medição da atividade enzimática dos complexos da CRM é um elemento fundamental no processo de diagnóstico (McFarland and Turnbull, 2009). A informação espectrofotométrica fornece dados sobre a atividade enzimática máxima dos componentes catalíticos dos vários complexos da CRM (Haas *et al*, 2008). Contudo, não há um consenso universal padronizado para estes ensaios, levando a uma grande variabilidade inter-laboratorial nos resultados (Haas *et al*, 2008).

Quando nos focamos nos resultados obtidos para a atividade enzimática dos complexos da CRM no doente 12, os resultados com mais impacto são a atividade do complexo I e III. No complexo III, verifica-se um aumento significativo da atividade, embora haja uma diminuição estatisticamente significativa do nível de transcrito e uma diminuição ligeira dos níveis de expressão do polipeptídeo. Sabe-se que as proteínas codificadas pelo mtDNA são apenas uma parte do proteoma mitocondrial e a sua interação com as proteínas codificadas pelos genes nucleares determinam o estado patológico de um individuo (Montoya *et al*, 2009). Portanto, o facto da atividade do complexo III não se encontrar diminuída, mas pelo contrário, se encontrar anormalmente elevada de forma significativa, não indica que a alteração não tenha impacto a nível funcional. Isto é, uma vez que o complexo III apenas tem o Citocromo B como subunidade codificada pelo mtDNA, talvez haja uma influência compensatória por parte dos genes nucleares que codificam as outras subunidades do complexo de forma a promover um aumento da atividade deste complexo, tal como foi sugerido por Mimaki *et al* (2010). Uma forma de se conseguir identificar este efeito compensatório, seria através da análise dos transcritos de todos os genes que codificam as proteínas envolvidas no funcionamento do complexo III, onde talvez se pudesse verificar o aumento de expressão dos transcritos para alguns desses genes, devido à regulação da expressão genética (Glatz *et al*, 2011). Recentemente, foi proposto que alterações na expressão de genes nucleares envolvidos na função ou biogénese mitocondrial poderiam ocorrer em resposta a alterações mais dramáticas na função mitocondrial ou nas necessidades energéticas da célula (Cannon *et al*, 2011).

Por outro lado, talvez a diminuição na atividade do complexo I, na doente 12, associada à diminuição dos níveis de proteína ND4, e da diminuição significativa do transcrito do gene *MT-ND4*, se deva à interação desta variação de sequência, com patogenicidade provável, em sinergia com alguma alteração de sequência ao nível dos

genes que codificam as subunidades do complexo I, principalmente na subunidade ND4. No sentido de averiguar o efeito sinergístico da alteração m.14771C>A, propõe-se a sequenciação de todos os genes que codificam subunidades do complexo I, começando pelo *MT-ND4*.

Apesar dos nossos resultados serem muito interessantes, sob o ponto de vista científico, o presente trabalho tem algumas limitações. No que diz respeito ao estudo da CRM, as observações bioquímicas em fibroblastos de doentes com mutações no mtDNA são muito variáveis (Rodenburg, 2011). A medição da atividade de cada complexo isolado evitaria algumas dificuldades encontradas no ensaio espetrofotométrico, onde a medição da transferência de eletrões através da CRM pode "mascarar" um défice ligeiro, porque a ligação das enzimas exerce uma grande influência no fluxo de eletrões através da CRM (McFarland and Turnbull, 2009). Assim, é proposto que se complemente o trabalho com outro método como BN-PAGE (*blue-native-polyacrilamide gel eletroforesis)*, que é uma técnica muito eficaz, que permite isolar os complexos da CRM intactos, a partir da MIM, e deste modo identificar defeitos na montagem de cada complexo (Williams *et al*, 2001; Haas *et al*, 2008; McFarland and Turnbull, 2009). Além disso, alterações a nível da tradução são frequentemente caracterizadas por um padrão anormal de agrupamento da CRM, mostrando defeitos na montagem dos complexos I, IV e V. Assim, a BN-PAGE, associada a *Western-blotting,* representa uma ferramenta de confiança para identificar estas deficiências (Rötig, 2011). Outra técnica que poderá ajudar a encontrar diminuições subtis da atividade catalítica, que não se conseguem detetar por espectrofotometria, é a imunofluorescência, que permite avaliar os fibroblastos individualmente possibilitando a deteção mesmo de um pequeno número de células deficientes (de Paepe *et al*, 2006).

Outra limitação deste estudo é o facto de terem sido usadas amostras de apenas dois indivíduos saudáveis como controlo. Assim, a situação ideal seria obter mais biópsias de pele de indivíduos saudáveis, de modo a aumentar o grau de confiança nos resultados. Contudo, é extremamente difícil e a cultura de fibroblastos humanos sé um processo moroso, no que diz respeito à obtenção do número suficiente de células para os diferentes estudos.

No que diz respeito às 11 alterações de sequência para as quais não foi possível obter fibroblastos para estudo, apenas foram caracterizadas através dos critérios indiretos, como a natureza da mutação, a sua frequência em controlos e a conservação evolutiva do nucleótido/aminoácido.

Assim, sabemos que todas estão ausentes nos 210 controlos analisados e que têm um índice de conservação evolutiva do aminoácido entre 95 e 100%.

Quanto à natureza da mutação podemos dividi-las em três tipos diferentes: alterações nos tRNAs, alterações sinónimas e alterações *misense*.

As alterações nos tRNA parecem particularmente importantes, uma vez que podem alterar a atividade enzimática de vários complexos da CRM, por estarem envolvidos na tradução de todas as proteínas, levando a uma sintomatologia muito grave e frequentemente fatal. Quando observamos os resultados da atividade enzimática dos complexos da CRM, para os dois doentes que apresentam alterações em tRNAs, doente 4 com m.7496T>C (*MT-TS1*) e doente 10 com m.14706A>G (*MT-TE*), podemos verificar que há uma diminuição significativa da atividade enzimática de vários complexos (Tabela 4). Estes dados reforçam o potencial papel patogénico destas duas alterações.

No caso das alterações sinónimas, como se verificou, há uma diminuição acentuada do reconhecimento dos codões formados, devido à alteração, em todas as alterações sinónimas (Tabela 3). A falta de reconhecimento do codão, por parte dos tRNAs, pode provocar uma alteração na estrutura da proteína, devido a defeitos na sua montagem ou uma diminuição na síntese proteica.

Nas alterações de sequência que alteram o aminoácido, como já foi referido, é importante analisar o impacto da alteração e o domínio proteico onde se insere. A alteração p.L18P (correspondente a m.8418T>C) na proteína codificada pelo gene *MT-ATP8*, envolve a mudança de uma leucina para a prolina, num domínio transmembranar da proteína. Tal como acontecia para a alteração p.P9T, a mudança de um aminoácido para a prolina, ou de uma prolina para outro aminoácido, tem inevitavelmente consequências estruturais devido à sua estrutura em anel que faz com que tenha maior restrição de conformação. A alteração p.F214L (correspondente a m.9166T>C) encontra-se no domínio *C*-terminal da proteína codificada pelo gene *MT-ATP6*, provocando uma alteração do aminoácido aromático (fenilalanina) para um

aminoácido hidrofóbico (leucina). Por último, a alteração p.G167D (correspondente a m.15246G>A) da proteína Cit B, leva à mudança de um aminoácido hidrofílico para um com carga negativa. Assim, como podemos constatar, as 4 alterações *misense* levam à troca de um aminoácido por outro com propriedades muito diferentes, exaltando a importância que estas alterações poderão ter na estrutura e função das proteínas.

As evidências apresentadas colocam estas alterações como um bom alvo a estudar na tentativa de provar a sua patogenicidade. Deste modo, o nosso principal objetivo futuro é estudá-las a nível experimental, usando a mesma abordagem deste estudo, mas tendo em conta, e tentando superar, as limitações já enumeradas.

6. Conclusão

De acordo com os critérios de patogenicidade e com a análise preliminar, apenas a alteração m.12013A>G obtém uma pontuação de 30 pontos, uma vez que foi detetada em heteroplasmia, em 3 doentes independentes, com conservação evolutiva no nucleótido e proteína, associada a défice de atividade de um complexo da CRM, tanto no tecido afetado como noutro tecido estudado. Além disso, não foi detetada em indivíduos saudáveis e apesar de não alterar o aminoácido, diminui grandemente a frequência do uso codão no código genético mitocondrial, podendo alterar o seu reconhecimento pelos anticodões, na síntese da proteína. Com esta pontuação, a alteração é considerada definitivamente uma mutação patogénica, podendo o estudo funcional para esta alteração, vir a reforçar o seu papel patológico.

Além desta, a alteração m.14771C>A atinge 24 pontos, uma vez que o doente 12 apresentou diminuição da atividade de um complexo e um efeito compensatório na atividade do complexo III, mostrou uma ligeira diminuição dos níveis de expressão proteica e diminuição significativa dos níveis do transcrito nos estudos funcionais. Também a conservação evolutiva do nucleótido e da proteína, as diferentes propriedades dos aminoácidos, o domínio proteico onde se insere a alteração e a sua ausência em controlos, são considerados na atribuição de probabilidade elevada de patogenicidade a esta alteração de sequência.

Todas as outras alterações no estudo alcançaram pontuações que as colocam como potencialmente patogénicas. Contudo, para nenhuma delas foram efetuados ainda estudos funcionais, e o estudo bioquímico, na maior parte dos casos, foi realizado apenas para linfócitos o que limita a determinação da patogenicidade no estudo, tendo em conta as características particulares do mtDNA como a heteroplasmia e especificamente tecidular. Isto é, estudos espectrofotométricos em amostras de outro tecido poderão vir a comprovar um défice na atividade de um ou vários complexos da CRM para os doentes com estas alterações. Por outro lado, também se poderão vir a conhecer mais casos de indivíduos com estas alterações, podendo assim levar a um aumento na pontuação, de acordo com os critérios disponíveis na licenciatura.

Dado o número de genes que codificam as proteínas mitocondriais e a heterogeneidade clínica dos doentes, parece continuar a não ser possível estabelecer

um diagnóstico definitivo para todas as alterações novas no mtDNA (Rodenburg, 2011).

Em todo o caso, podemos considerar que, mesmo com alguma limitação, o presente trabalho representa na contribuição importante na caracterização de novas alterações no mtDNA e a sua correlação com os fenótipos bioquímicos e clinico.

Os dados apresentados sugerem que há uma forte probabilidade das alterações novas, em análise no presente estudo, serem a causa genética da doença.

7. Referências bibliográficas

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403-410.

Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Standen R, Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465.

Attardi G, Chomyn A, Montoya J, Ojala D (1982). Identification and mapping of human mitochondrial genes. *Cytogenet Cell Genet*, 32:85-98.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4):248-249.

Baltimore D (1970). Viral-RNA dependent DNA polymerase. *Nature*, 226:1209-1211.

Cannon MV, Dunn DA, Irwin MH, Brooks AI, Bartol FF, Trounce IA, Pinkert CA (2011). Xenomitochondrial mice: Investigation into Mitochondrial Compensatory Mechanisms. *Mitochondrion*, 11:33-39.

De Degli Esposti M, Carelli V, Ghelli A, Ratta M, Crimi M, Sangiorgi S, Montagna P, Lenaz G, Lugaresi E, Cortelli P, (1994) Functional Alterations of the mitocondrially encoded ND4 subunit associated with Leber´s Hereditary optic Neuropathy. *FEBS Lett*, 352:375-9.

De Paepe B, Smet J, Leroy JG, Seneca S, George E, Matthys D, Maldergen LV, Scalais E, Lissens W, de Meirleir L, Meulemans A, Coster RV (2006). Diagnostic Value of immunostaing in Cultured Skin Fibroblasts from Patients with Oxidative Phosphorylation Defects. *Pediatr Res*, 59:2-6.

DiMaurao S, Schon E (1998). Nuclear power and mitochondrial disease. *Nat Genet*, 19:214-15.

DiMauro S, Schon E (2001). Mitochondrial DNA mutations in Human Disease. *Am J Med Genet*, 106:18-26.

DiMauro R, Davidzon G (2005). Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med*, 37:222-232.

DiMauro S (2007). Mitochondrial DNA Medicine. *Biosci Rep*, 27:5-9.

Elliot HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF (2008). Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am J Hum Genet*, 83:254-260.

Fisher N, Meunier B (2001). Effects of mutations in mitochondrial Cytochrome *b* in yeast and man deficiency, compensation and disease. *Eur J Biochem*, 268:1155-1162.

Glatz C, D'Aco K, Smith S, Sondheimer N (2011). Mutation in the mitochondrial $tRNA^{val}$ causes mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. *Mitochondrion*, 11:615-619.

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci*, 77:6715-19.

Grazina M. (2004). *Genoma Mitocondrial e Défice Energético no diagnóstico das Doenças da Cadeia Respiratória Mitocondrial*. Coimbra: Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra. Tese de Doutoramento.

Grazina MM, Diogo LM, Garcia PC, Silva ED, Garcia TD, Robalo CB, Oliveira CR (2007). Atypical presentation of Leber´s Hereditary Optic Neuropathy associated to mtDNA 11778G>A point mutation – a case report. *Eur J Paediatr Neurol,* 11:115-118.

Grazina MM (2012). Mitochondrial Respiratory Chain: Biochemical analysis and criterion for deficiency in diagnosis. *Methods Mol Biol*, 837:73-91.

Greaves LC, Reeve AK, Taylor RW, Turnbull DM (2012). Mitochondrial DNA and Disease. *J Pathol*, 226:274-286.

Haas RH, BChir MB, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, Wong LC, Cohen BH, Naviaux RK (2008). The In-Depth Evaluation of Suspected Mitochondrial Disease: The Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis. *Mol Genet Metab*, 94:16-37.

Holt IJ, Harding AE, Morgan, Hugles JA (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myophaties*. Nature*, 331:717-719.

Houshmand M, (2003) Mitochondrial DNA Mutations, Pathogenicity and Inheritance. *Iran J Biotech*, 1:1-18.

Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007). Selective degradation of mitochondrial by mitophagy**.** *Arch Biochem Biophys*, 462:245-253.

Kumar P, Henikoff S, Ng PC. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 4(7):1073-81.

Macmillan C, Lach B, Shoubridge EA (1993). Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs ($tRNA^{Leu}$(3243)) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: the role of mitotic segregation. *Neurology*, 43:1586-90.

Malik AN, Shahni R, Rodriguez-de-Ledesma A, Laftah A, Cunningham P (2011). Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: Accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Comm*, 412:1-7.

McFarland R, Elson JL, Taylor RW, Howell N, Turnbull DM (2004). Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when “definitely maybe” is not good enough. *Trends Genet*, 20:591-6.

McFarland R, Turnbull DM (2009). Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *J Intern Med*, 265:210-28.

Mimaki M, Hatakeyama H, Komaki H, Yokoyama M, Arai H, Kirino Y, Suzuki T, Nishino I, Nonaka I, Goto Y (2010). Reversible infantile respiratory chain deficiency: a clinical and molecular study. *Ann Neurol,* 68:845-54.

MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, http://www.mitomap.org, 2011.

Montoya J, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E (2009). 20 years of human mtDNA pathogenic point mutations: Carefully Reading the pathogenicity criteria**.** *Biochem Biophys Acta*, 1787:476-83.

Nass S, Nass M (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J Cell Biol*, 19:593-629.

Parfait B, Rustin P, Munnich A, Rötig A (1998). Co-amplification of Nuclear Pseudogenes and Assessment of Heteroplasmy of Mitochondrial DNA Mutations. *Biochem Biophys Res Comm*, 247,57-59.

Qian Y, Zhou X, Liang M, Qu J, Guan MX (2011). The altered activity of complex III may contribute to the high penetrance of Leber´s hereditary optic neuropathy in a Chinese family carrying the ND4 G11778A mutation. *Mitochondrion*, 11:871-7.

Rodenburg RJT (2011). Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis*, 34:283-292.

Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat J, Letellier T (2003). Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*, 370:751-762.

Rötig A, Munnich A (2003). Genetic features of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders. *J Am Soc Nephrol*, 14:2997-3007.

Rötig A (2011). Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis. *Biochem Biophys Acta*, 1807:1198-1205.

Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, Langping H, Whittaker RG,Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM (2008). Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol*, 63:35-39.

Schapira A (2006). Mitochondrial Disease. Lancet, 368:70-82.

Temin HM and Muzatani S (1970). RNA-dependent DNA polymerasein virions of Rous Carcinoma virus. *Nature*, 266:1211-1213.

Tourmen Y, Baris O, Dessen P, Jacques C, Malthièry Y, Reynier P (2002). Structure and Chromosomal Distribution of Human Mitochondrial Pseudogenes. *Genomics*, 80:71-7.

Vendelbo MH, Nair KS (2011). Mitochondrial longevity pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1813:634-44.

Vincze T, Posfai J, Roberts R.J (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*. 31: 3688-3691

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza A, Elsas LJ, Nikoskelainen EK (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber´s hereditary optic neuropathy. *Science*, 242:1427-1430.

Wallace DC (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, 51:440-450.

Wang J, Schmitt ES, Landsverk ML, Zhang VW, Li F, Graham BH, Craigen WJ, Wong LC (2012). An integrated approach for classifying mitochondrial DNA variants: one clinical diagnostic laboratory´s experience. *Genet Med,* 14:620-6.

Weber K, Wilson JN, Taylor L, Brierley E, Johnson MA, Turnbull DM, Bindoff LA (1997). A New mtDNA mutation Showing Accumulation with time and restriction to Skeletal Muscle. *Am J Hum Genet,* 60:373-380.

Williams SL, Scholte HR, Gray RGF, Leonard JV, Schapira A, Taanman JW (2001). Immunological Phenotyping of Fibroblasts Cultures from Patients with a Mitochondrial Respiratory Chain Deficit. *Lab Invest*, 81:1069-1077.

Wong LC (2007). Pathogenic mitochondrial DNA mutations in protein-coding genes. *Muscle Nerve*, 36:279-293.

Wong LC (2010). Molecular Genetics of Mitochondrial Disorders. *Res Dev Disabil*, 16:154-162.

Yarham JW, Al-Dosary M, Blakely EL, Alston CL, Taylor RW, Elson JL, McFarland R (2011). A comparative Analysis Approach to Determining the Pathogenicity of Mitochondrial tRNA Mutations*. Hum Mutat*, 32:1319-25.

Zhang A, Bandelt H, Jia X, Zhang W, Li S, Yu S, Wang D, Zhuang X, Zhang Q, Yao Y (2011). Is Mitochondrial $tRNA^{phe}$ variant m.593T>C a Synergistically Pathogenic Mutatiosn in Chinese LHON Families with m.11778G>A? *PLoS ONE*, 6 (10):e26511.