

Agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho e que tenho a certeza que, sem a colaboração de cada um deles, não teria chegado a bom termo, o meu mais profundo e sincero agradecimento:

Expresso o meu agradecimento à Professora Doutora Manuela Grazina, por me ter acolhido no seu grupo de trabalho e por me ter dado a possibilidade de realizar este projeto. Pela disponibilidade prestada, e por partilhar o seu conhecimento para a construção deste trabalho.

Ao Professor António Portugal, por ter aceite me acompanhar como orientador interno e sempre demonstrar o seu interesse por este estudo durante a sua realização.

À equipa clínica que seguiu os doentes dos quais foram retiradas as amostras para realização do estudo, pela colaboração e cedência de dados clínicos, em particular à Sra. Professora Doutora Isabel Santana, responsável da Consulta de Demências do Serviço de Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

À Mestre Maria João Santos, que transmitiu os seus conhecimentos e experiência e pelo apoio laboratorial durante este período.

À equipa do LBG, em especial ao Doutor João Pratas, pela disponibilidade e apoio prestado sempre que necessitei.

À futura Doutora Daniela Luís e à Mestre Tânia Sousa pela amizade, ajuda, companheirismo e apoio. Por tudo que transmitiram e por todos os momentos que se criaram nesta importante etapa.

Àqueles que sempre foram um pilar para mim, os meus pais. Por me terem permitido todo o meu percurso académico até ao momento, contribuírem em todos os sentidos para a minha formação e desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha família, que para além se me ter apoiado constantemente, sempre se preocupou e me incentivou.

Aos meus amigos Ana Vera Marinho, Cristiana Pereira e Duarte Silva, pela amizade que sempre se manteve e nos rodeia e pela cumplicidade que tanto caracteriza a nossa relação de anos.

Aos amigos que ganhei durante o Mestrado, Cláudia Amaral, Daniela Pereira, Ismael Neiva, Mafalda Santos, Maria João Pereira, Rita Fonseca, Sónia André e Tânia Afonso, pela boa companhia, bons momentos e tudo aquilo que se tornaram.

À Sabrina, por sempre ser aquela que eu considero como minha irmã.

Índice

Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xiii
Abstract	xv
1 Introdução	1
1.1 Demência	2
1.2 Demência frontotemporal	4
1.2.1 Classificação da DFT	5
1.2.2 Epidemiologia da DFT	7
1.2.3 Caracterização da DFT	8
1.2.3.1 Apresentações clínicas	9
1.2.3.1.1 Variante comportamental da DFT (vcDFT)	9
1.2.3.1.2 Demência Semântica (DS)	10
1.2.3.1.3 Afasia não fluente progressiva (ANFP)	10
1.2.3.1.4 Síndrome corticobasal (SCB)	11
1.2.3.1.5 Paralisia supranuclear progressiva (PSP)	11
1.2.3.1.6 Doença do neurónio motor (DNM)	11
1.2.3.2 Histopatologia da DFT	11
1.2.3.2.1 DLFT-tau	12
1.2.3.2.2 DLFT-TDP	13
1.2.3.2.3 DLFT-FUS	14
1.2.3.2.4 DLFT-UPS/DLFT-outras	15
1.2.3.3 Genética da DFT	15
1.2.3.3.1 Mutações associadas ao gene <i>MAPT</i>	16
1.2.3.3.2 Mutações associadas ao gene <i>CPORF72</i>	16
1.2.3.3.3 Mutações associadas ao gene <i>GRN</i>	16
1.3 A mitocôndria: estrutura e função	18

1.3.1	A cadeia respiratória mitocondrial	19
1.3.2	O genoma mitocondrial	20
1.3.3	Mutações no mtDNA	23
1.3.4	Hereditariedade materna	24
1.3.5	Segregação mitótica, homoplasmia e heteroplasmia	24
1.3.6	Efeito limiar	25
1.4	Disfunção mitocondrial e neurodegenerescência	26
1.4.1	Citocromo C Oxidase	29
2	Objetivos	32
3	Material e métodos	34
3.1	Amostras biológicas	35
3.2	Amplificação dos genes <i>MT-CO</i> por PCR	36
3.3	Eletroforese em gel de agarose	40
3.4	Purificação dos produtos de PCR	41
3.5	PCR de sequenciação e sequenciação automática	41
3.6	Análise das sequências obtidas	44
3.7	Análise <i>in silico</i> das alterações detetadas	44
4	Resultados	46
4.1	Análise da sequência genética dos genes <i>MT-CO</i>	47
5	Discussão	57
5.1	Análise <i>in silico</i> das alterações	60
5.2	Análise geral das alterações detetadas	63
6	Conclusões e perspectivas futuras	66
7	Referências bibliográficas	69

Índice de figuras

Figura 1	Índices de envelhecimento, dependência e de longevidade relativos a 2010	3
Figura 2	Terminologia da DFT	6
Figura 3	Imagens de estudos imagiológicos de casos de DFT	9
Figura 4	Representação da estrutura da mitocôndria	18
Figura 5	Representação da cadeia respiratória mitocondrial e dos seus complexos enzimáticos	21
Figura 6	O genoma mitocondrial humano (mtDNA)	22
Figura 7	Distribuição aleatória de mitocôndrias normais e mutantes; homoplasmia normal e mutante e diferentes graus de heteroplasmia	25
Figura 8	Representação gráfica do efeito limiar	26
Figura 9	Relação entre a produção de ROS e as alterações na mitocôndria como alvo	28
Figura 10	Representação da enzima citocromo c oxidase (COX) ou complexo IV da CRM	30
Figura 11	Representação esquemática das fases da PCR	38
Figura 12	Exemplo de uma sequência obtida através do processo de sequenciação automática	44
Figura 13	Imagem de um dos géis de agarose obtida neste estudo para confirmação de amplificação por PCR	47
Figura 14	Eletroferogramas que mostram as sequências obtidas por sequenciação automática com as alterações nas posições m.7245A>G e m.7300T>C	48
Figura 15	Distribuição (%) do número de doentes com e sem alterações detetadas nos genes <i>MT-CO</i>	48
Figura 16	Dados relativos à distribuição (%) das alterações detetadas nos doentes estudados para as diferentes variantes clínicas da DFT para os genes <i>MT-CO</i>	40
Figura 17	Resultados da análise da patogenicidade e conservação evolutiva, relativos às alterações m.7300T>C e m.7245A>G	55

Índice de tabelas

Tabela 1	Caracterização da amostragem de doentes utilizada neste estudo	35
Tabela 2	Localização dos genes MT-CO no mtDNA humano	36
Tabela 3	Dados relativos aos primers usados na PCR	39
Tabela 4	Variações de sequência detetadas nos genes <i>MT-CO</i> no presente estudo e respectiva descrição	50

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
Ala	Alanina
ANFP	Afasia não fluente progressiva
APP	Afasia progressiva primária
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico ou aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	ATP sintetase
CHMP2B	Do inglês <i>charged multivesicular body protein 2B</i>
COX	Citocromo c oxidase
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
C9ORF72	Do inglês <i>chromosome 9 open reading frame 72</i>
DA	Doença de Alzheimer
ddNTP	Di-desoxi-nucleótidos trifosfato, com N= A (adenina), C (citosina), G (guanina), T (timina)
DFT	Demência frontotemporal
DFT-DNM	DFT com doença do neurónio motor
DFT-ELA	DFT com esclerose lateral amiotrófica
DGA	Doença do grão argirofílico
DLFT	Degenerescência lobar frontotemporal
DLFT-FUS	DLFT com patologia FUS positiva
DLFT-tau	DLFT com patologia tau positiva
DLFT-TDP	DLFT com patologia TDP-43 positiva
DLFT-U	DLFT com patologia tau negativa, ubiquitina positiva
DLFT-UPS	DLFT com patologia TDP-43 negativa e FUS negativa
DMSO	Di-metil-sulfóxido
dNTP	Desoxi-nucleótidos tri-fosfato, com N= A (adenina), C (citosina), G (guanina), T (timina)
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DS	Demência semântica

ELA	Esclerose lateral amiotrófica
FUS	Do termo inglês <i>fused-in-sarcoma</i>
g	Força centrífuga
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico ou glutamato
Gly	Glicina
GRN	Progranulina
His	Histidina
Ileu	Isoleucina
kDa	KiloDalton
Leu	Leucina
LHON	Neuropatia Ótica Hereditária de Leber, do inglês <i>Leber's hereditary optic neuropathy</i>
MAPT	Do termo inglês <i>microtubule associated protein tau</i>
MELAS	<i>Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke like episodes</i>
MERRF	<i>Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers</i>
Met	Metionina
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
MMI	Membrana mitocondrial interna
DNM	Doença do neurónio motor
mRNA	RNA mensageiro
MSTD	Do inglês <i>sporadic multiple system tauopathy</i>
mtDNA	DNA mitocondrial, do inglês <i>mitochondrial DNA</i>
MT-ATP	Genes do mtDNA que codificam as subunidades da ATPase
MT-CO	Genes do mtDNA que codificam as subunidades da COX
MT-CYB	Genes do mtDNA que codificam as subunidades do <i>cyt b</i>
MT-ND	Genes do mtDNA que codificam as subunidades da NADH desidrogenase
nDNA	DNA nuclear, do inglês <i>nuclear DNA</i>
OXPHOS	Do inglês <i>oxidative phosphorylation</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação da polimerase em cadeia, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>

Pi	Fosfato inorgânico
POLG	DNA polimerase gama
Pro	Prolina
PSP	Paralisia supranuclear progressiva
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
rRNA	RNA ribossómico
SCB	Síndrome corticobasal
Ser	Serina
TARDP	Do inglês <i>transactive response to DNA binding protein</i>
<i>Taq</i>	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
Thr	Treonina
tRNA	RNA de transferência
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UTR	Do inglês <i>untranslated regions</i>
UV	Ultravioleta
V	Volts
Val	Valina
vcDFT	Variante comportamental da DFT
VCP	Do termo inglês <i>vasolin-containing protein</i>
µL	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Graus Celsius

Resumo

A demência frontotemporal é uma doença neurodegenerativa associada a atrofia dos lobos frontal e temporal. É a segunda demência de início precoce mais comum, caracterizando-se pela alteração comportamental progressiva e disfunção executiva e/ou dificuldades na linguagem. É muito heterogênea relativamente às suas características clínicas, patológicas e genéticas.

O genoma mitocondrial (mtDNA) humano codifica componentes chave da cadeia respiratória mitocondrial e apresenta características próprias, distintas do genoma nuclear. A neurodegenerescência e os processos que a ligam à mitocôndria envolvem diversos tipos de mecanismos e têm-se proposto várias hipóteses para explicar a influência da mitocôndria nas diversas doenças neurodegenerativas. Quando existem mutações no mtDNA, a função energética comprometida é um defeito bioquímico comum nestas doenças, sendo também muitas vezes mencionada a alteração na produção e regulação de espécies reativas de oxigênio (ROS). De facto, a sobrevivência dos neurónios depende da função mitocondrial e do fornecimento de oxigênio, uma vez que o ATP é produzido pela OXPHOS. Este facto é da maior importância, pois são necessários níveis bastante elevados de ATP para manter as funções neuronais normais. Assim, os defeitos bioenergéticos resultantes de mutações no mtDNA parecem relacionar-se com estas doenças, nomeadamente na doença de Alzheimer (DA).

Para além de vários estudos que comprovam a relevância mitocondrial em diversos processos neurodegenerativos, também na DFT têm surgido evidências da importância da mitocôndria e do seu DNA, tendo sido encontradas variações na sequência do mtDNA. No entanto, o número de estudos é ainda reduzido, tendo sido ainda estudadas poucos genes, surgindo deste modo uma necessidade de aprofundar a investigação da relação do mtDNA com esta doença. Assim, o objetivo deste estudo foi proceder à sequenciação dos três genes *MT-CO* codificados pelo mtDNA em 70 doentes de DFT, recorrendo à sequenciação automática.

No total, foram encontradas 55 variações de sequência, com uma maioria correspondendo a polimorfismos, uma pequena parte (9) a mutações somáticas no

mtDNA, previamente identificadas em determinadas linhas celulares, ou substituições publicadas em diversas doenças e uma nova alteração. Do número total de variações de sequência detetadas (em um ou mais doentes), 7 conduziam à alteração de aminoácido na sequência da proteína, para as quais se realizou uma análise *in silico*. Foram encontradas alterações em 80% dos doentes estudados, tendo-se detetado uma alteração nova (m.7300T>C), não existente nas bases de dados. Observou-se, de um modo geral, um maior número de alterações na subunidade 1, de maiores dimensões, em comparação com as subunidades 2 e 3.

A grande parte das alterações identificadas no presente estudo são polimorfismos. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de estarem envolvidos na etiopatogenia da DFT, juntamente com outros fatores não analisados. São necessários estudos adicionais, para entender melhor o papel do mtDNA nesta doença.

Palavras-chave: Demência frontotemporal; mtDNA; COX; Variações de sequência.

Abstract

Frontotemporal dementia is a neurodegenerative disorder associated with atrophy of frontal and temporal lobes. It is the second most common early-onset dementia, characterized by progressive behavioral changes and executive dysfunction and/ or language difficulties. With regard to the clinic, pathological and genetic characteristics, it is considered to be quite heterogeneous.

The mitochondrial genome (mtDNA) encodes key components of human mitochondrial respiratory chain and has particular characteristics, distinct from the nuclear genome. The neurodegeneration and the neurodegenerative processes related to mitochondria involve various types of mechanisms and there have been proposed several hypotheses on how mitochondria may play a role in several neurodegenerative diseases. When there are mtDNA mutations, they compromise energetic function, which still is a very common biochemical defect in these pathologies, but production and regulation of reactive oxygen species is often referred. Indeed, neurons survival depend on mitochondrial function and oxygen supply, as the ATP is produced by OXPHOS. This fact is of utmost importance, since very high levels of ATP are required to maintain the normal neuronal function. Thus, defects resulting from bioenergetic mtDNA mutations seem to be related to these diseases, including in Alzheimer's disease (AD).

Besides several studies that demonstrate the mitochondrial relevance in different neurodegenerative diseases, also in DFT it is evident the importance of mitochondria and its DNA, and sequence mtDNA variations were reported. However, the number of studies is still limited, and a small number of genes have been studied, stressing out the need to further investigate the relationship of mtDNA with this disease. The objective of this study was to carry out the sequencing of the mtDNA encoded *MT-CO* genes in 70 patients with FTD, using automated sequencing.

A total of 55 sequence variations were found, the majority corresponding to polymorphisms, a small portion (9) to mtDNA somatic mutations previously identified in particular cell lines, substitutions reported in specific diseases and one novel

alteration. From the total number of variations identified (detected in one or more patients), 7 induce alteration in the amino acid sequence of the protein, for the which an *in silico* analysis was performed. Alterations were found in 80% of the patients and it was detected a novel variation, not yet described in databases, m.7300T>C. In general, there were more alterations in the subunit 1, which is larger, in comparison with the subunits 2 and 3.

The majority of the alterations found in this study are polymorphisms. This fact does not allow to exclude the possibility of being involved in FTD pathogenesis of the DFT, with other factos not analysed. Further studies are necessary to better understand the role of mtDNA in this disease.

Keywords: Frontotemporal dementia; mtDNA; COX; Sequence variations.