



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Investigação dos genes *MT-CO* na Demência Frontotemporal

Catarina Isabel Mendes Martins

---

2012



# DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Investigação dos genes *MT-CO* na Demência Frontotemporal

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Grazina (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e orientação interna do Professor Doutor António Portugal (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Catarina Isabel Mendes Martins

---

2012

Copyright© Catarina Martins 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 autorização e referência apropriada.

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 authorization and acknowledgement.

Laboratório de Bioquímica Genética (LBG),  
Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC)  
e Faculdade de Medicina da Universidade de  
Coimbra (FMUC).

O trabalho experimental incluído nesta dissertação está integrado no projeto PTDC/SAU-EPI/121811/2010, financiado pela Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT) (PI - Professora Doutora Manuela Grazina).



## **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
<b>1   Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1   Demência</b>	<b>2</b>
<b>1.2   Demência frontotemporal</b>	<b>4</b>
<b>1.2.1   Classificação da DFT</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2   Epidemiologia da DFT</b>	<b>7</b>
<b>1.2.3   Caracterização da DFT</b>	<b>8</b>
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
<b>1.3   A mitocôndria: estrutura e função</b>	<b>18</b>

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 respetiva 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 <sub>2</sub>	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 oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
rRNA	RNA ribossômico
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 heterogénea 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 oxigénio (ROS). De facto, a sobrevivência dos neurónios depende da função mitocondrial e do fornecimento de oxigénio, 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.

## **1. Introdução**

---

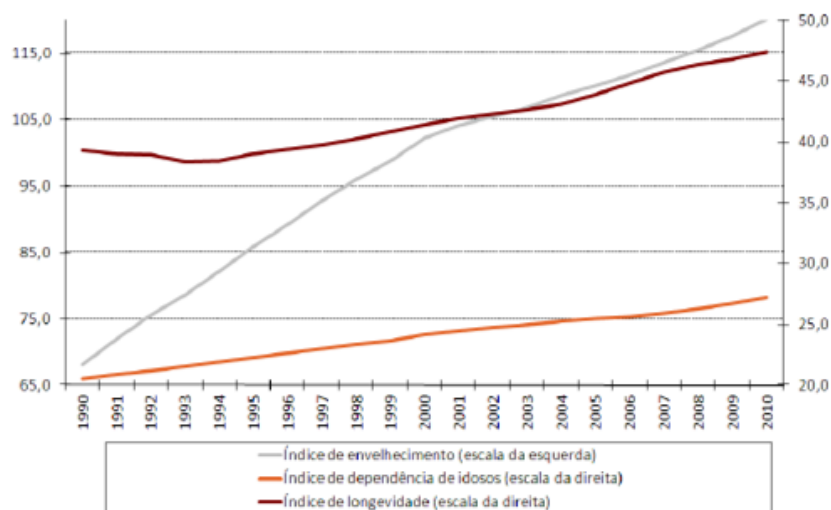
## 1.1. Demência

As demências constituem um problema de saúde pública da maior importância, afetando ambos os sexos e todos os grupos sociais (Antuono, 1999).

A demência caracteriza-se por uma deterioração progressiva e, em geral, lenta, das funções cognitivas (Santana e Cunha, 2005). Sob o ponto de vista clínico, de acordo com a 10ª edição da Classificação Internacional das doenças, consiste numa deficiência adquirida da memória e capacidades cognitivas, tendo como consequência uma diminuição da capacidade do doente para lidar com atividades quotidianas, presente num período mínimo de seis meses (ICD-10). Na 4ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais (DSM-IV) da Associação Americana de Psiquiatria (AAP), a demência foi descrita como uma síndrome caracterizada por deterioração adquirida e persistente da função cognitiva que afeta a memória e, pelo menos, outra função cerebral. As áreas afetadas podem estar relacionadas com a linguagem (afasia), a capacidade para idealizar e realizar movimentos coordenados para levar a cabo um ato voluntário (apraxia), o reconhecimento do que se percebe através dos sentidos (agnosia), ou a capacidade executiva do indivíduo (planeamento, organização, sequenciação e abstração). Os défices cognitivos devem ser suficientemente importantes para alterar as relações sociais e/ou laborais do indivíduo, representar um declínio relativamente a um nível anteriormente superior de funcionamento e não ocorrer, exclusivamente, no contexto de delírio (DSM-IV).

No que diz respeito a este campo, o envelhecimento da população e o aumento da esperança de vida têm-se tornado fatores epidemiológicos que merecem especial consideração. De facto, a população, em particular de países desenvolvidos, tem-se tornado cada vez mais envelhecida, o que também se aplica a Portugal. O Instituto Nacional de Estatística (INE) aponta para o crescente peso social da população idosa. Em 2010, o índice de longevidade atingiu o valor mais elevado observado desde 1990, cerca de 47,4 (Figura 1). Além do mais, o fator tempo é preponderante na abordagem das demências, não só porque se relaciona com o aumento da percentagem de idosos na população, mas também porque a prevalência destas doenças aumenta com a idade. Um estudo realizado na população do norte de Portugal, estimou que a prevalência global da demência nessa região era de 2,7%, aumentando com o avanço da idade e diminuindo

com o nível de educação (Nunes *et al.*, 2010). Tendo em conta o contexto demográfico exposto, compreende-se porque é que a demência tem surgido como um dos problemas de saúde pública mais importantes da atualidade.



**Figura 1 - Índices de envelhecimento, dependência e de longevidade relativos a 2010 (Instituto Nacional de Estatística, 2010).**

Geralmente, a síndrome clínica de demência segue três expressões principais. A primeira trata-se da componente neuropsicológica, que inclui várias alterações, como deficiências de memória, afasia, apraxia, ou dificuldades na atenção. A segunda consiste num elemento neuropsiquiátrico, que surge associado a sintomas e distúrbios comportamentais. Estes podem incluir depressão, delírios e agressividade (Alva e Potkin, 2003; Manning, 2004; Mirakhur *et al.*, 2004; Kester e Scheltens, 2009). Por último, referem-se os défices nas atividades do quotidiano, que se podem manifestar logo desde o início da doença. À medida que esta avança, estes problemas tornam-se mais evidentes e agravados, afetando atividades básicas como comer, vestir e tomar banho (Lyketsos *et al.*, 2002; Geldmacher, 2004; Steinberg *et al.*, 2006).

A história clínica pode ser a chave para o diagnóstico da demência. No entanto, esta informação prestada pelo doente, pode estar comprometida pelas alterações que está a sofrer. Deste modo, torna-se importante a existência de um acompanhante informador, no sentido de complementar ao máximo a história do doente (Santana e Cunha, 2005). Pode dizer-se que o diagnóstico poderá envolver uma grande variedade de avaliações, de

acordo com o subtipo de demência e a rapidez com que evolui, sendo variável de doente para doente. O diagnóstico poderá então passar por avaliação clínica, neuropsicológica, neuropatológica, exames laboratoriais, estudos de imagem e ainda estudos genéticos (Santana e Cunha, 2005).

É de referir que todas as demências são degenerativas e progressivas, pelo que é importante a sua deteção e o diagnóstico diferencial dos subtipos de demência, o que requer uma avaliação qualificada. Todo este processo é complexo e envolve fontes múltiplas de informação (Camicioli, 2006).

## **1.2. Demência frontotemporal**

Ao longo da história, têm existido diversas denominações da demência frontotemporal (DFT) e muitos desenvolvimentos na classificação da doença.

Em 1892, Arnold Pick descreveu os primeiros casos de demência, caracterizados neuropatologicamente por uma atrofia lobar frontotemporal; clinicamente apresentavam alteração do comportamento e da linguagem (Pick, 1892; Pick, 1906). Alguns anos mais tarde, Alois Alzheimer descreveu a patologia celular das inclusões intraneuronais, designadas posteriormente por corpos de Pick: “corpúsculos esféricos argirofílicos e aparentemente sem estrutura definida, localizados na periferia do núcleo das células piramidais do hipocampo”. Assim, surgiu a denominação de Doença de Pick, que perdurou vários anos relacionada com esta entidade anátomo-patológica (Alzheimer, 1911; Gans, 1922; Onari e Spatz, 1926; Schneider, 1927; Kertesz, 1996).

Nos anos 80 e 90, diversos grupos começaram a reconhecer a existência de vários doentes com características clínicas compatíveis com as de doentes de Pick que, no entanto, não apresentavam nem a atrofia lobar, nem as alterações celulares características. Foi nesta época que foram propostos os primeiros critérios clínicos para a DFT, pelos grupos de Manchester e Lund (The Lund and Manchester Groups, 1994). A aceitação progressiva da DFT como uma forma de demência com uma efetiva heterogeneidade patológica e genética, deu origem ao aparecimento de múltiplas entidades com segregação discutível (Santana e Cunha, 2005). Deste modo, a doença começou a ser designada de várias formas, muitas vezes apenas com base na sua

apresentação clínica. Estas designações incluíam demência frontal, demência frontal e doença do neurónio motor, afasia progressiva ou demência semântica. Por outro lado, algumas surgiram da relação com o substrato patológico ou pelas suas características genéticas (Santana e Cunha, 2005).

Ao longo do tempo, foram surgindo mais tentativas de uniformização dos critérios clínicos, patológicos e histológicos, no sentido de acompanhar a expansão de conhecimentos nesta área. Em 2001, McKhann *et al.* publicaram uma atualização dos critérios para o diagnóstico clínico e patológico da DFT, resultante de um encontro com o objetivo de permitir aos clínicos o reconhecimento adequado da doença. De acordo com estas normas, a DFT incluía um grupo de demências degenerativas primárias, que apresentasse predominantemente sintomas lobares frontais e/ou lobares temporais. Este grupo de desordens abrangia assim a doença de Pick, degeneração lobar frontotemporal, degeneração lobar frontotemporal com doença neuronal motora, degeneração corticobasal e paralisia supranuclear progressiva (McKhann *et al.*, 2001; Santana e Cunha, 2005)

A alteração mais recente deu-se em 2009, sendo a utilizada até ao presente. No entanto, torna-se ainda comum o uso de terminologias anteriores e difícil estabelecer uniformidade das mesmas a vários níveis.

### **1.2.1. Classificação da DFT**

A DFT é genética e patologicamente heterogénea, sem uma relação clara entre o fenótipo clínico e a patogénese subjacente (Rohrer, 2011).

Atualmente, e de acordo com o último consenso, em 2009, a doença apresenta uma classificação distinta sob o ponto de vista clínico e sob o ponto de vista patológico. As síndromes clínicas estão, no geral, relacionadas com algum tipo de patologia. Nesta terminologia são também enquadrados dados genéticos da doença (McKenzie *et al.*, 2009).

Foram encontradas mutações em seis genes codificantes de diferentes proteínas associadas à DFT genética: *progranulin* (GRN), *microtubule associated protein tau* (MAPT), *vasolin-containing protein* (VCP), *transactive response DNA-binding protein* (TARBP),



*fused-in-sarcoma* (FUS) e *charged multivesicular body protein 2B* (CHMP2B) (Rohrer, 2011).

O espectro clínico da DFT inclui síndromes distintas, designadamente a variante comportamental da DFT e as variantes relacionadas com a linguagem - a afasia não fluente progressiva e a demência semântica (denominadas frequentemente, no conjunto das duas, por afasia progressiva primária - APP). Há também uma sobreposição da DFT com a síndrome corticobasal e paralisia supranuclear progressiva e ainda com a doença neuronal motora ou síndromes parkinsónicas. A nível patológico, a doença denomina-se por degenerescência lobar frontotemporal (DLFT). A DLFT divide-se em dois tipos de patologia: a patologia tau-positiva (DLFT-tau) e a patologia tau-negativa, ubiquitina-positiva (DLFT-U). A primeira engloba casos de degenerescência corticobasal, paralisia supranuclear progressiva ou patologia associada a mutações no gene *MAPT*. Por sua vez, a DLFT-U subdivide-se em três grupos: patologia TDP-43-positiva (DLFT-TDP), patologia FUS-positiva (DLFT-FUS) e uma minoria de casos correspondente a uma patologia TDP-43 e FUS-negativa, designada de DLFT-UPS. Estes três grupos patológicos apresentam ainda vários subtipos (Gorno-Tempini, 2004A; Cairns *et al.*, 2007; Mackenzie *et al.*, 2010). Esta terminologia da doença encontra-se resumida na Figura 2.

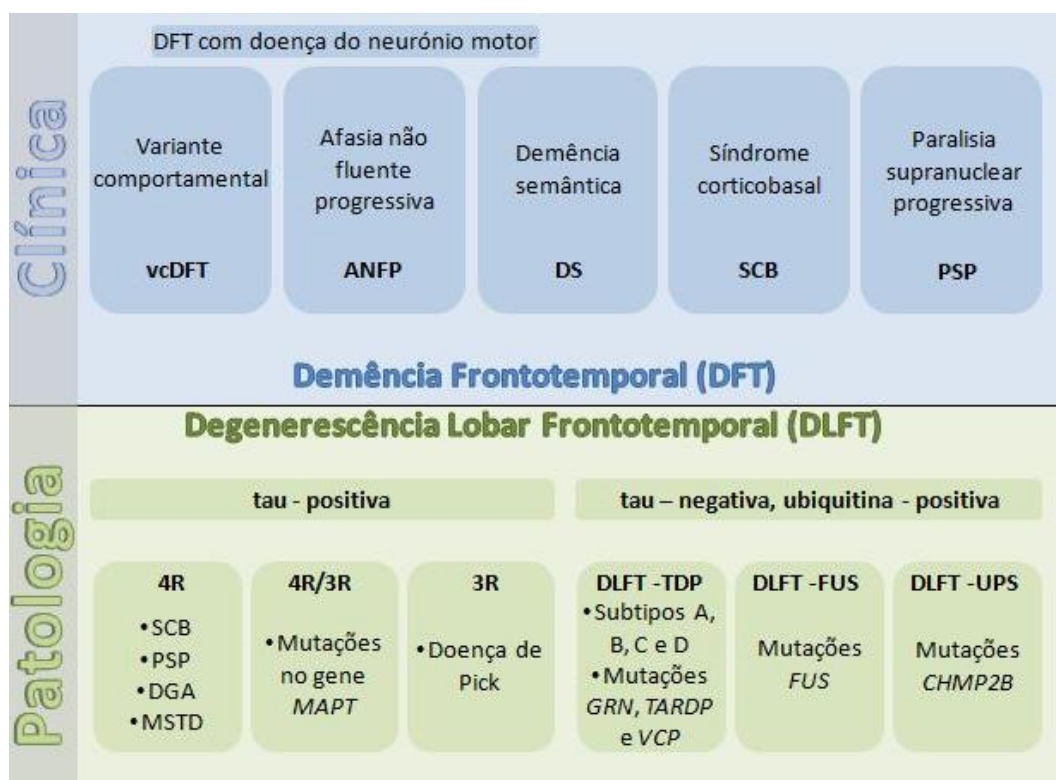


Figura 2 - Terminologia da DFT (adaptado de Rohrer, 2011).

Nunca é demais mencionar que esta área está em constante desenvolvimento, pelo é natural que a classificação se vá alterando de acordo com esse avanço. Nesse sentido, acrescenta-se que, ainda mais recentemente, diversos autores classificam a DLFT de forma distinta da apresentada anteriormente. Efetivamente, a terminologia DLFT-U surgiu pelo facto de a maioria dos casos revelar imunoreatividade à ubiquitina. Porém, em 2006, verificou-se que na vasta maioria dos cérebros destes doentes a proteína ubiquitinada seria a TDP-43, o que, mais uma vez, levou a uma nova visão sobre a DFT (Neuman *et al.*, 2006). Consequentemente, a classificação da patologia foi reorganizada e, mais recentemente, grande parte dos autores não recorrem aos termos “DLFT-tau” e “DLFT-U”, usando diretamente os termos DLFT-tau (na presença inclusões tau), DLFT-TDP (com inclusões positivas para a ubiquitina e TDP-43) e DLFT-FUS (presença de inclusões positivas para a ubiquitina e FUS). Por ser a mais recente e atualizada, esta será a terminologia usada neste estudo.

### **1.2.2. Epidemiologia da DFT**

De acordo com estudos clínicos, a doença ocorre mais frequentemente no período pré-senil, entre os 45-60 anos (Sjogren e Wallin, 2001). Estudos mais recentes relatam que a idade média de início da doença se encontra entre os 50-60 anos de idade, em que cerca de 10% dos doentes desenvolver a doença após os 70 anos. O período de duração da doença pode ser bastante variável, de 2 a 20 anos, de acordo com a patologia envolvida (Hodges *et al.*, 2003; Seelar *et al.*, 2008). A DFT afeta igualmente ambos os géneros, sendo de carácter hereditário em 30-50% dos casos (Sjogren e Andersen, 2006).

A prevalência exata da DFT continua ainda por conhecer. Uma vez que ainda não foram realizados muitos estudos neste sentido, os dados atuais resultam de estimativas. Os dados que revelam maiores prevalências provêm de dois estudos da Inglaterra e de Itália, com uma prevalência da doença a rondar os 15-22 casos por cada 100.000 habitantes, entre os 45-64 anos (Ratnavalli *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2003; Borroni *et al.*, 2010). Por sua vez, um estudo efetuado na Holanda mostrou uma prevalência bastante inferior, de 9,4 casos em cada 100.000 habitantes (Rosso *et al.*, 2003). No entanto, é de realçar que estes dados dizem respeito a uma faixa etária superior, entre os 60-69 anos

de idade. A prevalência para idades mais avançadas parece ser inferior, tendo sido estimada num estudo sueco estimou uma prevalência de 3,1 casos por 100.000 habitantes, numa população de 85 anos de idade (Gislason *et al.*, 2003). No intervalo aproximado de idades em que a DFT é mais frequente, dois estudos apontaram resultados bastante semelhantes: 3,5 e 4,1 casos por 100.000 habitantes, entre os 45-64 anos (Knopman *et al.*, 2004; Mercy *et al.*, 2008).

Em Portugal, não se sabe ao certo a prevalência deste tipo de demência, tendo Guimarães *et al.* (2006) referido a possibilidade de estar subdiagnosticada. De acordo com este estudo, 7% de todas as demências diagnosticadas eram relativas a doentes com DFT, correspondendo esta percentagem a 20 doentes. Este grupo de doentes era composto por 11 mulheres e 9 homens, com idades compreendidas entre os 46-78 anos, (média de  $59 \pm 9$  anos). Os sintomas começaram a ser notados pelas famílias cerca de  $3,0 \pm 1,0$  anos antes, equivalendo a um início médio da doença de  $57 \pm 9$  anos de idade (Guimarães *et al.*, 2006).

### **1.2.3. Caracterização da DFT**

A DFT apresenta uma apresentação clínica heterogénea. A variante comportamental, demência semântica e afasia não fluente progressiva partilham de um início da doença insidioso, com um declínio progressivo, mas variável. Cada síndrome clínica encontra-se associada a um comprometimento cerebral topográfico distinto. Assim, enquanto a variante comportamental se associa a uma disfunção no lobo frontal direito e na porção do lobo temporal anterior, a afasia não fluente progressiva associa-se a uma disfunção do lobo frontotemporal esquerdo e a demência semântica a um défice da porção do lobo temporal anterior (Seelaar *et al.*, 2011). A variante comportamental é o subtipo mais comum, contribuindo para cerca de metade dos casos de DFT (Johnson *et al.*, 2005; Seelaar *et al.*, 2008). Todos os subtipos podem ser acompanhados por doença do neurónio motor (DFT-DNM), sendo mais comum na variante comportamental, ocasionalmente na afasia não fluente progressiva (ANFP) e, raramente, na demência semântica (DS) (Seelaar *et al.*, 2011). De modo semelhante, a esclerose lateral amiotrófica (ELA) também pode ocorrer juntamente com qualquer uma das variantes clínicas (DFT-

ELA), mais frequentemente na variante comportamental da DFT (vcDFT) (Lomen-Hoerth, 2004).

#### 1.2.3.1. Apresentações clínicas da DFT

##### 1.2.3.1.1. Variante comportamental da DFT (vcDFT)

A vcDFT inclui mais de metade dos casos de DFT, sendo a forma com maior índice de hereditariedade. Geralmente, estes doentes apresentam alterações progressivas da personalidade, conduta interpessoal e modulação emocional e, frequentemente, comprometimento a nível da linguagem (Neary *et al.*, 1988; Piguet *et al.*, 2011). Uma característica comum é existir apatia, que se manifesta na passividade, motivação e vida social diminuídas, podendo também ser acompanhada de desinibição e comportamento impulsivo. No que toca ao quotidiano, é usual os doentes possuírem um comportamento alimentar anormal, descuido nos cuidados pessoais ou serem incapazes de gerir as suas finanças. Podem-se observar ainda comportamentos estereotipados, visíveis em gestos como o bater do pé (Seelaar *et al.*, 2011).

Estudos que analisaram casos de doentes de meia-idade com esta síndrome, mostraram envolvimento, em particular, das áreas frontal e paralímbica (Figura 3A). À medida que a gravidade da doença aumenta, nota-se uma atrofia mais difusa em áreas semelhantes, atingindo áreas mais laterais (Schroeter *et al.*, 2008; Seeley *et al.*, 2008). Contudo, ainda não está claro se este padrão é uma característica da vcDFT independente da patologia subjacente (heterogénea), ou se patologias diferentes têm padrões distintos de atrofia (Seelaar *et al.*, 2011).

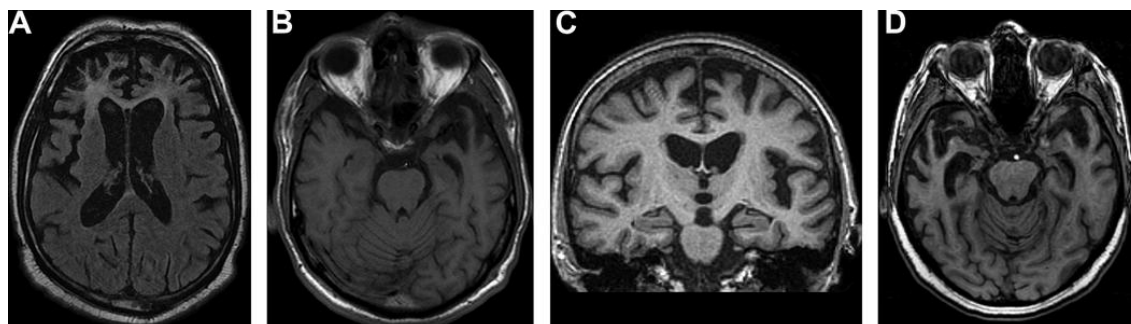


Figura 3 - Imagens de estudos imagiológicos de casos de DFT. (A) – Atrofia frontal num paciente com vcDFT; (B) – Atrofia do lobo temporal esquerdo num paciente de DS; (C) – Atrofias da porção inferior do lobo frontal e da porção superior do lobo temporal num paciente com ANFP; (D) – doente com atrofia predominante domlobo temporal direito (Seelaar *et al.*, 2012).

#### 1.2.3.1.2. Demência Semântica (DS)

A demência semântica é uma afasia fluente progressiva, caracterizada pela perda de conhecimento do significado das palavras (Hodges e Patterson, 2007). Esta síndrome é descrita pela dificuldade em encontrar palavras, com uma diminuição do vocabulário do doente. No entanto, o seu discurso permanece fluente e a sintaxe também é correta. Muitas vezes, conjuntamente com estas dificuldades, há uma incapacidade em reconhecer pessoas, especialmente se o lobo temporal direito se encontrar afetado (Figura 3B). Destaca-se igualmente o comportamento compulsivo, que se reflete no facto de o doente se centrar em objetos (predominância de lobo temporal esquerdo afetado) ou letras, palavras e símbolos (predominância de lobo temporal direito afetado) (Mummery *et al.*, 1999; Goedert *et al.*, 2012).

A DS é a síndrome com menor índice de hereditariedade na DFT, e parece ser aquela com o ritmo de progressão mais lento. Partilha, com a vcDFT, uma idade de início mais precoce (Johnson *et al.*, 2005; Roberson *et al.*, 2005). Por vezes, estes doentes podem vir a desenvolver alterações comportamentais semelhantes às observadas na vcDFT, o que usualmente ocorre em estádios mais avançados da doença (Hodges e Patterson, 2007).

#### 1.2.3.1.3. Afasia não fluente progressiva (ANFP)

A ANFP está relacionada com disfunções associadas à linguagem expressiva. De facto, estes doentes começam a perder a capacidade de falar fluentemente, preservando, relativamente, a compreensão das palavras (Grossman *et al.*, 1996). Inicialmente, costumam falar menos que o comum e usar frases mais curtas. Há dificuldade em encontrar as palavras ao longo do seu discurso. Nesta síndrome, também podem surgir características similares à vcDFT, mas são mais ligeiras, sendo a apatia a mais comum (Gorno-Tempini *et al.*, 2004B). No que diz respeito ao índice de hereditariedade, é inferior ao da vcDFT e superior ao da DS. Há uma grande heterogeneidade clínica na ANFP. As áreas-chave que parecem estar afetadas são a porção anterior do lobo frontal esquerdo, as regiões insulares e o córtex pré-motor (Figura 3C) (Nestor *et al.*, 2003; Gorno-Tempini *et al.*, 2004A).

#### 1.2.3.1.4. Síndrome corticobasal (SCB)

Esta variante caracteriza-se por sintomas extrapiramidais, consistindo em rigidez assimétrica progressiva e distonia e por sinais de disfunção cortical. Estes refletem-se na forma de apraxia, perda de sensibilidade cortical, mioclonia e heminegligência. Os doentes com SCB podem também possuir afasia ou ainda características comportamentais típicas da vcDFT. Esta síndrome tem sido associada a atrofia frontoparietal assimétrica e insular (Boxer *et al.*, 2006; Seeley *et al.*, 2009).

#### 1.2.3.1.5. Paralisia supranuclear progressiva (PSP)

A apresentação clínica desta síndrome inclui oftalmoplegia supranuclear vertical, com dificuldades em olhar para cima, bradicinesia, distonia axial e rigidez, paralisia pseudobulbar e instabilidade postural. Cerca de mais de metade dos casos desenvolvem disfunção cognitiva. A apatia, lentidão mental e fluência verbal reduzida são comuns. A PSP possui uma hereditariedade baixa. Estudos imagiológicos mostraram atrofia nas áreas motoras suplementares (Litvan *et al.*, 1996; Whitwell *et al.*, 2010A).

#### 1.2.3.1.6. Doença do neurónio motor (DNM)

A DNM encontra-se associada a disfunção cognitiva, observando-se que, em aproximadamente 30% dos casos, há envolvimento do lobo frontal médio - cerca de 3% dos casos de DFT (Shaw, 2010). Um dos primeiros sinais que pode surgir é uma fase psicótica, na qual o doente tem ilusões bastante evidentes (Vance *et al.*, 2006). A atrofia muscular, fragilidade e fasciculações afetam muitas vezes as extremidades superiores e a língua. A doença progride rapidamente, sendo que a sobrevivência ronda os três anos (Seelaar *et al.*, 2011). De forma idêntica a algumas das síndromes já descritas, podem existir sintomas relacionados com a variante comportamental da DFT (Lomen Hoerth *et al.*, 2002).

#### 1.2.3.2. Histopatologia da DFT

Normalmente, as síndromes clínicas da DFT encontram-se associadas a uma das patologias da DLFT, que se classificam de acordo com a deposição de proteínas anormais específicas. Tal como toda a organização e conhecimento acerca esta doença foi

evoluindo, também a informação patológica foi crescendo e sofrendo atualizações. No presente, a DLFT está subclassificada em DLFT-tau, DLFT-TDP e DLFT-FUS (Mackenzie *et al.*, 2010; Whitwell e Josephs, 2012). Cada uma destas categorias patológicas possui um número de diferentes diagnósticos patológicos ou variantes, distinguidos com base na distribuição e aparência morfológica das inclusões proteicas e nas características histológicas específicas dessas patologias. Apenas um pequeno número de casos raros de DLFT permanecem sem classificação, aos quais é atribuída a classificação DLFT-outras (Josephs *et al.*, 2011).

#### 1.2.3.2.1. DLFT-tau

A aglomeração de agregados proteicos é uma marca própria de diversas doenças neurodegenerativas, caracterizadas por disfunção neuronal e morte celular. As inclusões de proteína tau são características da doença de Pick, PSP, degenerescência corticobasal - DCB (pertencente ao espectro da SCB), tauopatias esporádica multisistêmica (MSTD) e doença por grãos argirofílicos (DGA), englobando ainda doentes com DLFT familiar, nos quais a deposição da proteína tau está relacionada com mutações no gene *MAPT* (Hutton *et al.*, 1998; Goedert e Spillantini, 2006). Assim, às síndromes que surgem associadas à deposição de tau anormal, dá-se a denominação de “tauopatias”.

A deposição ou agregação de tau anormal foi o primeiro tipo de observação patológica a ser descrita. A função desta proteína reside na sua ligação e estabilização dos microtúbulos, envolvidos na manutenção da forma neuronal, na formação dos processos axonais e dendríticos e no transporte de carga nos neurónios. O tráfego neuronal é crucial para a função sináptica. Os microtúbulos intervêm no transporte de mitocôndrias, componentes de vesículas sinápticas, subunidades de canais iônicos, recetores e proteínas *scaffold*. Uma vez que as sinapses são altamente vulneráveis a anomalias no tráfego neuronal, perturbações a este nível podem causar comprometimento no processo de neurotransmissão e, conseqüentemente, conduzir a degenerescência sináptica (Brunden *et al.*, 2009).

A proteína tau é codificada pelo gene *MAPT*, localizado no cromossoma 17 (Neve *et al.*, 1986). No cérebro humano adulto, o *splicing* alternativo do mRNA dos exões 2, 3 e 10 geram seis isoformas da tau. Estas diferem na presença ou ausência de uma ou duas inserções acídicas no terminal-N e se possuem três ou quatro repetições de um motivo

conservado de tubulina, no terminal-C (Lee *et al.*, 1989). Esta zona de repetição liga-se aos microtúbulos e promove a sua montagem, em que a isoforma com quatro repetições (4R-tau) se liga com uma afinidade superior aos microtúbulos, comparativamente à isoforma com três repetições (3R-tau) (Lu e Kosik, 2001). Mutações a nível do gene que codifica a proteína tau estão na base da alteração da proporção das suas isoformas, comprometimento da ligação aos microtúbulos e aumento da agregação da tau em filamentos (Hasegawa *et al.*, 1998; Goedert *et al.*, 1999).

Os agregados de tau podem explicar a neurodegenerescência de diversas formas e vários estudos já o comprovaram. Efetivamente, estes aglomerados podem atuar como barreiras físicas no citoplasma, destabilizando as funções celulares normais (Lin *et al.*, 2003). Até ao momento, também se observou que os aglomerados podem causar neurotoxicidade, pela redução da função normal da proteína (Cash *et al.*, 2003). Tendo em conta as suas funções, os processos neuronais normais estarão em causa, podendo assim levar à degenerescência dos neurónios. Além do mais, estudos mostraram que a proteína pode intervir no transporte neuronal ao longo dos microtúbulos através da inibição das proteínas motoras associadas (Lapointe *et al.*, 2009).

#### 1.2.3.2.2. DLFT-TDP

Esta é a variante patológica mais comum da DLFT (Josephs *et al.*, 2004; Lipton *et al.*, 2004). Neste caso, há uma patologia tau-negativa, em que a proteína prevalente é a *TAR DNA-binding protein* - TDP-43. A DLFT-TDP encontra-se dividida em quatro subtipos, cada um associado a um fenótipo clínico diferente. A TDP-43 é uma proteína expressa de forma ubíqua, com um papel importante na regulação do RNA, exercendo essa função de diversas formas. Estudos recentes revelaram que esta proteína se liga a grande parte do transcriptoma, preferencialmente a intrões, regiões 3' de mRNAs não traduzidas (UTRs) e RNAs não codificantes (Polymenidou *et al.*, 2011; Tollervey *et al.*, 2011). A localização da TDP-43 em grânulos de RNA envolvidos nos processos neuronais sugere que está envolvida no tráfego de RNA (Elvira *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Para além disso, também interage com a proteína *FUS*, outra *DNA/RNA binding protein* implicada na DLFT (Freibaum *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2010). Relativamente aos processos que a ligam à neurodegenerescência, ainda não são claros e pensa-se que existam vários mecanismos envolvendo esta proteína. A esse nível, foi proposta a possibilidade das vias de



neurodegenerescência estarem ligadas quer a um ganho ou perda de função da proteína (Ayala *et al.*, 2011; Polymenidou *et al.*, 2011).

A DLFT-TDP tipo 1 é o subtipo mais comum de entre os quatro, encontrando-se ligado a uma variedade de apresentações clínicas, o que torna o diagnóstico desta condição bastante complexo. Através de estudos imagiológicos, foram identificados padrões generalizados de atrofia da matéria cinzenta nos lobos frontal, temporal e parietal. Também foi observada atrofia assimétrica em vários doentes. O facto dos doentes deste subtipo apresentarem atrofia generalizada e assimétrica, pode explicar a razão pela qual os doentes com esta patologia apresentam diagnósticos clínicos tão variados (Rohrer *et al.*, 2010; Whitwell *et al.*, 2010B). O subtipo 1 correlaciona-se com mutações do gene *GRN* e com o recentemente descoberto *C9ORF72* (Whitwell *et al.*, 2010b; Dejesus-Hernandez *et al.*, 2011). Em relação ao tipo 2, há uma relação mais clara com a clínica, pois a maioria dos casos apresenta demência semântica e quase todos os doentes com DS evidenciam patologia DLFT-TDP do tipo 2. Consistentemente, a atrofia mais grave nos doentes deste subtipo é observada nos lobos temporais anteriores. Já no que respeita ao tipo 3, há uma ligação com a DNM. Tal como para o tipo 2, também há uma correlação clinicopatológica relativamente evidente, em que a maioria dos doentes com esta forma de DLFT é diagnosticada com vcDFT ou DFT com DNM (Mackenzie *et al.*, 2006; Josephs *et al.*, 2009; Josephs *et al.*, 2011). Os padrões frontal e médio de perda de substância cinzenta observados em doentes do tipo 3 estão de acordo com os padrões previamente observados em doentes com DLFT-DNM (Whitwell *et al.*, 2006).

#### 1.2.3.2.3. DLFT-FUS

Os casos de DLFT-FUS são os mais raros, das “proteínopatias” relacionadas com a doença, representando 1-6% dos casos de DLFT (Seelaar *et al.*, 2010). Estes doentes exibem um fenótipo bastante característico: os doentes são tipicamente jovens e com vcDFT, frequentemente com comportamentos estereotipados e obsessivo-compulsivos (Urwin *et al.*, 2010). Ao contrário das outras variantes patológicas da DLFT, a “assinatura” característica da DLFT-FUS parece ser a atrofia grave do núcleo caudado, especialmente se comparando com os casos de DLFT-tau ou DLFT-TDP (Josephs *et al.*, 2010). Apesar do número de estudos de doentes com esta patologia ser reduzido, os resultados mostraram ser bastante consistentes. Isto pode ser particularmente relevante em doentes com a

variante clínica comportamental que evidenciem atrofia do núcleo caudado e que sejam jovens ou relativamente jovens, 25 a 45 anos (Urwin *et al.*, 2010).

De forma similar à TDP-43, a FUS é uma *DNA/RNA binding protein* envolvida na regulação transcricional e no *splicing* e transporte do mRNA. A FUS tem tendência para formar agregados, tendo sido também propostos mecanismos de ganho ou perda de função tóxicos. Sun *et al.* (2011) propõem que as formas *misfolded* da proteína podem causar toxicidade através da ligação e sequestro dos RNAs essenciais, ou talvez ao interferir com o transporte normal, estabilidade ou metabolismo do RNA (Sun *et al.*, 2011).

#### 1.2.3.2.4. DLFT-UPS/ DLFT-outras

A DLFT-TDP e a DLFT-FUS contribuem para a maioria dos casos com patologia ubiquitina-positiva. No entanto, podem existir formas por descobrir, uma vez que, raramente, surgem casos com inclusões negativas quer para a TDP-43 quer para a FUS, mas positiva para componentes do *ubiquitin proteasome system* (UPS), denominando-se por FTLD-UPS (Holm *et al.*, 2009). Sabe-se que incluem doentes com mutações no gene *CHMP2B* (Rohrer *et al.*, 2011). Porém, alguns autores optam por não utilizar esta designação, recorrendo simplesmente ao termo “DLFT-outras” para se referirem a outros casos que não os mencionados nos pontos anteriores.

#### 1.2.3.3. Genética da DFT

Embora uma parte considerável dos casos de demência frontotemporal sejam esporádicos, ao contrário de outras demências, a DFT tem uma componente familiar bastante forte. De facto, cerca de 40 a 50% dos casos são diagnosticados como familiares, em que 10% mostram um padrão de hereditariedade autossómico dominante) (Seelaar *et al.*, 2008). As mutações mais comuns ocorrem nos genes *MAPT*, *C9ORF72* e *GRN* (Spillantini *et al.*, 1998; Cruts *et al.*, 2006; DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011). Os restantes genes nos quais foram encontradas mutações são os genes *TARDBP*, *FUS*, *VCP* e *CHMP2B* (Watts *et al.*, 2004; Skibinski *et al.*, 2005; Kovaks *et al.*, 2009; Ticozzi *et al.*, 2009). A DLFT familiar é mais comum em doentes com vCDFT e DFT-ELA e menos observada em doentes com DS (Rabinovici e Miller, 2010).

#### 1.2.3.3.1. Mutações associadas ao gene *MAPT*

As mutações a nível deste gene (localizado no cromossoma 17q21) representam cerca de 5% dos casos de DFT, podendo tratar-se de mutações sinónimas, deleções ou mutações intrónicas (Rademakers *et al.*, 2004). Tendo em conta as funções da proteína tau, codificada por este gene, já mencionadas anteriormente, estas mutações podem originar redução da afinidade da tau para os microtúbulos, conduzindo a comprometimento da sua formação, bem como da estabilidade e do transporte axonal. Algumas mutações aumentam o nível de proteína livre no citoplasma, promovendo a sua agregação, ao passo que outras levam à fosforilação anormal da tau, prejudicando a estabilização dos microtúbulos (Goedert e Jakes, 2005). Outras mutações afetam o *splicing* alternativo, gerando assim proporções alteradas das diferentes isoformas da proteína (Spillantini *et al.*, 1998). As mutações no gene *MAPT* são principalmente encontradas em doentes com vcDFT, com um início médio aos 50 anos de idade (Villa *et al.*, 2011).

#### 1.2.3.3.2. Mutações associadas ao gene *C9ORF72*

Após alguns estudos, que evidenciaram uma ligação entre o cromossoma 9q21-22 e famílias com DLFT-DNM, em 2011, dois grupos identificaram o gene responsável pela doença – a *open reading frame 72* do cromossoma 9 (*C9ORF72*). Ambos relataram uma expansão de seis nucleótidos (GGGGCC) no *C9ORF72* associada a um grande número de ELA familiar ou casos de DLFT-DNM com patologia TDP-43 (Dejesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011). A mutação em causa leva à perda de um transcrito de *splicing* alternativo, cuja função é ainda desconhecida. Os alelos selvagens apresentam cerca de 23-30 repetições, enquanto os mutantes têm mais de 100. No estudo de Dejesus Hernandez *et al.* (2011), os autores demonstraram que a mutação é uma das causas quer da DFT, quer da ELA familiar.

#### 1.2.3.3.3. Mutações associadas ao gene *GRN*

O gene *GRN*, também localizado no cromossoma 17q21, codifica para o *growth regulation factor progranulin*, pertencente a uma família de proteínas envolvidas em diversas funções biológicas, nomeadamente no desenvolvimento, cicatrização e processos inflamatórios (He e Bateman, 2003). Cerca de 5-10% de todos os casos de DFT

apresentam mutações neste gene. As mutações consistem geralmente em deleções, mutações *nonsense* e *frameshift*, que causam uma terminação prematura da proteína (Van Swieten e Heutink, 2008). Podem estar relacionadas com qualquer uma das variantes clínicas da doença, apesar de serem mais frequentemente encontradas na vcDFT e ANFP (Yu *et al.*, 2010). Doentes com mutações no gene possuem inclusões TDP-43 positivas, mostrando que uma redução nos níveis de progranulina causa acumulação de TDP-43 (Mackenzie *et al.*, 2006).

### 1.3. A mitocôndria: estrutura e função

As mitocôndrias são organelos intracelulares de morfologia variável, com um diâmetro transversal entre 0,1-0,5  $\mu\text{m}$  e comprimento variável. O número de mitocôndrias varia de acordo com o tecido, podendo ir de zero (caso dos eritrócitos) a 10 000 cópias por célula (Stryer, 1996). A origem destes organelos tem sido explicada com base na “Teoria endossimbiótica” (Margulis, 1981; Gray, 1989), que sugere a convivência ancestral, em simbiose, de uma proteobactéria (após entrada por endocitose) com o que poderia designar-se por célula primitiva, tendo surgido a partir dessa interação um único organismo vivo, conhecido como a célula atual.

No que diz respeito à sua estrutura (Figura 4), consistem em duas membranas separadas por um espaço intermembranar e uma matriz interna. A membrana mitocondrial interna (MMI) forma estruturas denominadas por cristas, alojando os complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Esta membrana funciona como barreira para a difusão iónica, crucial na formação de um gradiente protónico para a formação de ATP por este organelo. A matriz mitocondrial trata-se de um ambiente hostil que contém um grande número de enzimas envolvidas no ciclo de *Krebs* e na  $\beta$ -oxidação - metabolismo de hidratos de carbono e lípidos, respetivamente (Margeant *et al.*, 2002).

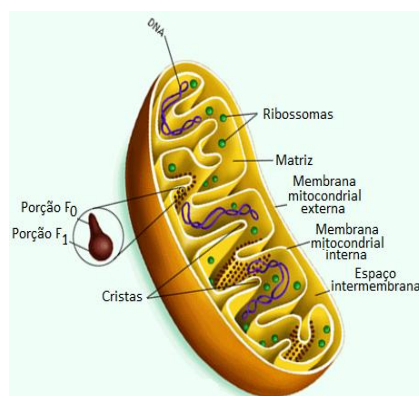


Figura 4 – Representação da estrutura da mitocôndria (<http://corporate.britannica.com/>).

Para além de fornecerem a maior parte da energia celular na forma de ATP, as mitocôndrias desempenham outras funções centrais na célula: formação e regulação de espécies reativas de oxigénio (ROS), controlo do transporte de cálcio citosólico e regulação do processo de apoptose através do poro mitocondrial de transição de permeabilidade (Wallace *et al.*, 2010). A capacidade deste organelo gerar ATP através de um sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS) levou, então, a que este se tornasse a principal fonte de energia celular, pelo que o funcionamento normal da célula eucariótica depende inteiramente do seu fornecimento (Lister *et al.*, 2005).

### 1.3.1.A Cadeia Respiratória Mitocondrial (CRM)

A via bioquímica final do metabolismo aeróbio é a fosforilação oxidativa, que ocorre na membrana mitocondrial interna através de uma estrutura de complexos, denominada por cadeia respiratória. Este processo depende de cinco complexos (I a V - complexo I: NADH desidrogenase; complexo II: succinato desidrogenase; complexo III: coenzima Q - citocromo *c* redutase, QCCR; complexo IV: citocromo *c* oxidase, COX; complexo V: ATP sintetase, ATPase), tendo como resultado a condensação de fosfato inorgânico (Pi) e adenosina difosfato (ADP) para produzir ATP (Grazina, 2004; McFarland e Turnbull, 2009).

Tal como o termo sugere, o processo de OXPHOS pode ser dividido em duas reações distintas: uma via oxidativa chamada respiração, que alimenta uma segunda via, a fosforilação do ADP em ATP. A primeira etapa consiste numa série de passos nos quais ocorre transferência de átomos de hidrogénio, provenientes de outras vias metabólicas tais como o ciclo de Krebs ou  $\beta$ -oxidação. Os eletrões dos hidrogénios são sequencialmente transferidos por compostos transportadores de eletrões (exemplo: NADH) para a cadeia de complexos, caracterizados por um potencial redox crescente e ligados entre si por intermediários – coenzima Q e citocromo *c*. Os hidrogénios são então aceites por um aceitador de eletrões, o oxigénio molecular, que é convertido num composto reduzido, a água. Como tal, forma-se um potencial de prótons na MMI, que armazena energia na forma de um gradiente químico (prótons) e electrostático (positivo no exterior, negativo no interior). A energia recolhida deste gradiente eletroquímico pode então ser usada para alimentar a segunda reação, a fosforilação, através da ATPase. A atividade desta leva à condensação do ADP e Pi em ATP e água. É importante referir que a estequiometria entre as duas reações da OXPHOS é flexível, variando de acordo com o *status* energético e as necessidades energéticas da mitocôndria e da célula (Spinazzola e Zeviani, 2009).

Outros fenómenos biológicos fundamentais que ocorrem na mitocôndria incluem o armazenamento e libertação de certos iões ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ), biossíntese de precursores nucleotídicos (uridina) e produção de ROS e regulação do seu nível. As espécies reativas de oxigénio podem causar danos a nível proteico (causando a sua oxidação), nos lípidos e no DNA. No entanto, as ROS também desempenham um papel fisiológico marcante, atuando como sinais que desencadeiam uma série de mecanismos homeostáticos

adaptativos e vias metabólicas, incluindo a própria OXPHOS. Além do mais, existe uma ligação complexa entre a eficiência da OXPHOS, o controlo do potencial eletroquímico membranar e a produção de ROS com a apoptose, uma via crucial a nível das células e tecidos e com papel preponderante em processos patológicos, como a neurodegenerescência ou cancro (Spinazzola e Zeviani, 2009).

### **1.3.2.O genoma mitocondrial**

Em todos os eucariotas, a formação e atividade da CRM (Figura 5) estão sob o controlo de dois genomas distintos: o genoma nuclear (nDNA) e o genoma mitocondrial (mtDNA). Em humanos, assim como em outros vertebrados, treze das cerca de oitenta e cinco proteínas que compõem os cinco complexos da OXPHOS são codificados pelo mtDNA (Spinazzola e Zeviani, 2009).

De facto, de entre os cinco complexos, apenas o complexo II é codificado exclusivamente pelo nDNA, sendo os restantes codificados pelos dois genomas (McFarland e Turnbull, 2009). Assim, para o complexo I (MT-ND), que é constituído por 45 polipeptídeos, o mtDNA codifica as subunidades ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6; para o complexo III (MT-CYB), formado por 11 polipeptídeos, a subunidade *cyt b*; para o complexo IV (MT-CO), constituído por 13 polipeptídeos, as subunidades COI, COII e COIII; e para o complexo V (MT-ATP), que tem 16 polipeptídeos, as duas subunidades ATP6 e ATP8 (Wallace *et al.*, 2010; MITOMAP, 2011). Desta forma, o nDNA codifica 80% dos restantes genes das proteínas da OXPHOS. Para além do mais, o nDNA codifica todos os genes das vias metabólicas mitocondriais e todas as enzimas imprescindíveis à biogénese mitocondrial, incluído a DNA polimerase gama (POLG), a RNA polimerase, fatores de transcrição mitocondriais e proteínas ribossomais da mitocôndria (Wallace *et al.*, 2007; Wallace *et al.*, 2010).

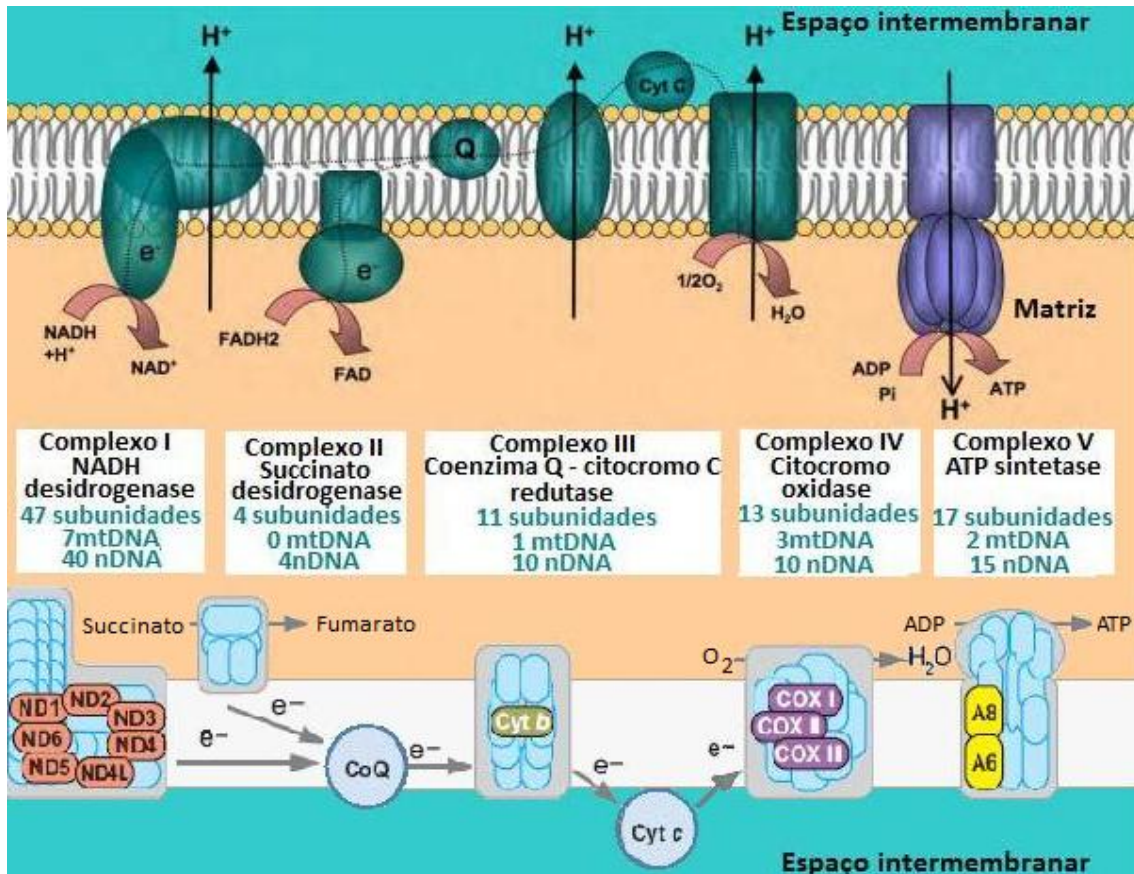


Figura 5 - Representação da cadeia respiratória mitocondrial e dos seus complexos enzimáticos (adaptado de DiMauro e Schon, 2008; Bellance *et al.*, 2009).

O DNA mitocondrial foi descoberto em 1963, tendo sido posteriormente provada a existência de múltiplas cópias desta molécula na matriz mitocondrial. Existem entre 2 a 10 cópias de mtDNA por mitocôndria, o que resulta em cerca de 1000-100.000 cópias por célula. Trata-se do único DNA extra cromossómico nas células humanas (Anderson *et al.*, 1981).

O genoma mitocondrial humano (Figura 6) apresenta-se como uma molécula circular de dupla cadeia com 16568 pb, que codifica 13 subunidades polipeptídicas essenciais no processo de OXPHOS. As cadeias diferem no seu conteúdo em desoxirribonucleótidos de guanina-citosina, mais elevado na cadeia pesada (HC) em relação à cadeia leve (LC). Para além destas subunidades, codifica 2 RNAs ribossomais (rRNA) - 12S e 16S - e 2 RNAs de transferência (tRNA), fundamentais na síntese dos 13 polipeptídeos a nível mitocondrial. Este genoma foi sequenciado na sua totalidade pela primeira vez em 1981 (Anderson *et*



*al.*, 1981) e revisto em 1999 (Anderson *et al.*, 1999), tendo sido encontradas algumas alterações em relação à original (citado de Grazina, 2004).

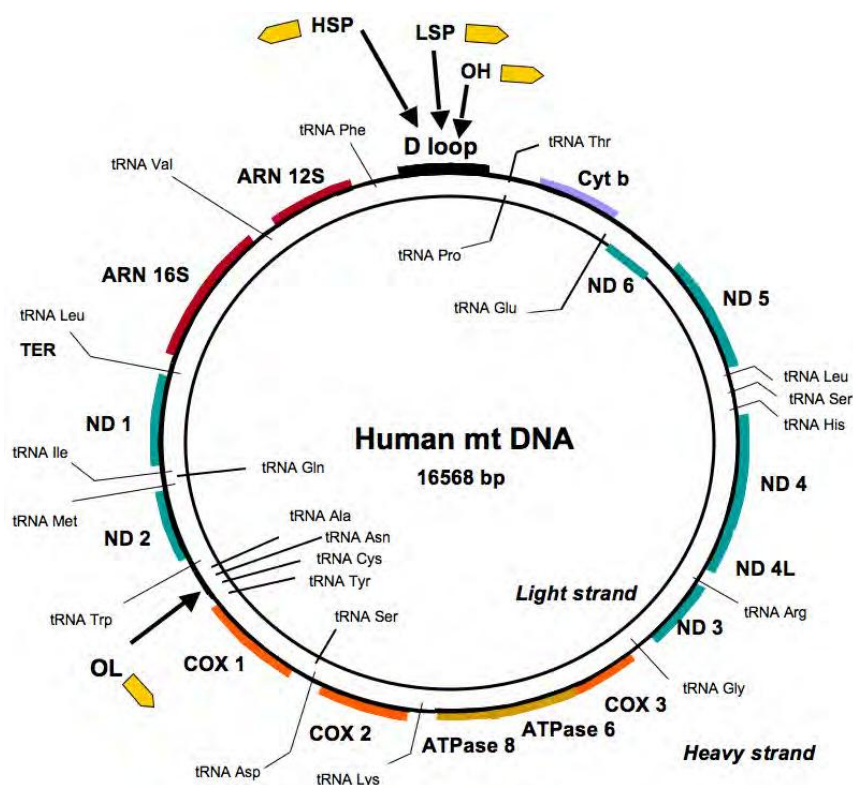


Figura 6 – O genoma mitocondrial humano (mtDNA). Os promotores das cadeias pesada e leve (HSP e LSP), a origem de replicação da cadeia pesada (OH) e a origem da cadeia leve (OL) estão reoresentados com seta. Os genes correspondentes aos polipeptídeos encontram-se representados a cores: a lilás o citocromo *b*; a azul as subunidades da NADH desidrogenase (ND1-6); a cor de laranja as subunidades da citocromo *c* oxidase (COX1-3); a amarelo as subunidades da ATPase (ATPase 6 e 8); a vermelho os rRNAs 12S e 16S. A preto a região D-LOOP (Bellance *et al.*, 2009).

O mtDNA possui um código genético próprio, distinto do nuclear, regulado por um sistema semiautónomo, no qual a replicação e transcrição dependem de fatores de origem nuclear, como a POLG. As seqüências reguladoras essenciais localizam-se no D-loop, uma região não codificante, situada entre os nucleótidos nas posições 16024-16576, que contém um fragmento da cadeia pesada em tripla cadeia, ligado de forma complementar à cadeia leve (Smeitink *et al.*, 2001; Grazina, 2004). No mtDNA dos mamíferos, ao contrário do nDNA, não existem intrões. Alguns genes chegam mesmo a sobrepor-se e quase de pode afirmar que cada par de bases individuais está ligado a um gene. No que diz respeito à organização dos genes neste genoma, existem algumas características que refletem as particularidades da expressão genética nas mitocôndrias

dos mamíferos. A maioria dos genes são expressos na mesma direção e os genes tRNA organizam-se na forma daquilo a que diversos autores designam por ponteados, isto é, entre os genes codificadores de rRNA ou proteínas. Em grande parte dos casos não existe separação entre os genes, sendo a última base de um determinado gene adjacente à primeira base do gene que se segue. Em alguns casos, pode existir sobreposição de, mais frequentemente, uma base, de forma a que a última base de um gene serve de primeira base do seguinte (Grazina, 2004; Wallace *et al.*, 2010).

É importante referir algumas particularidades que caracterizam o genoma mitocondrial e o seu papel nas doenças.

### **1.3.3. Mutações no mtDNA**

A primeira mutação patogénica a nível do mtDNA foi descrita em 1988 e desde então já foram descritas mais de 300 mutações (Brandon *et al.*, 2005), que incluem mutações pontuais, ou rearranjos (deleções ou duplicações) ou depleção, resultando num efeito bioquímico que poderá afetar a síntese proteica normal (se a sequência de tRNA ou rRNA é alterada) ou o funcionamento normal da cadeia respiratória (se um dos genes codificantes de alguma subunidade das enzimas da cadeia for afetado) (Turnbull *et al.*, 2010).

Efetivamente, o mtDNA apresenta uma elevada taxa de mutações relativamente ao nDNA, cerca de 10 a 20 vezes superior. Tal pode estar relacionado com diversas causas, nomeadamente com o facto de o mtDNA se encontrar bastante próximo da MMI, onde se localiza a CRM e portanto, existir uma grande proximidade com a produção de ROS. Além do mais, o mtDNA não se encontra protegido com histonas e os seus mecanismos de reparação são pouco eficientes. A acrescer a estas razões, há o facto de o mtDNA ser codificante quase na sua totalidade, pelo que a probabilidade de uma alteração ser mais lesiva é muito superior (Grazina, 2004; Wallace *et al.*, 2010).

#### **1.3.4. Hereditariedade materna**

Durante o processo de fertilização, todo o mtDNA deriva do ovócito, uma vez que, apesar de algumas mitocôndrias do espermatozoide penetrarem no óvulo, são posteriormente destruídas, resultando assim numa forma de transmissão uniparental. Deste modo, uma mãe portadora de uma mutação pontual irá transmiti-la a toda a descendência (masculina e feminina), mas apenas as filhas a irão transmitir aos seus descendentes (Sutovsky *et al.*, 1999; DiMauro e Schon, 2008). Apenas foi relatado um único caso em se observou herança paterna de mtDNA, mas não foram identificados mais casos posteriormente.

#### **1.3.5. Segregação mitótica, homoplasma e heteroplasma**

Quando há divisão celular, ocorre segregação mitótica e dá-se uma distribuição aleatória das cópias de mtDNA nas células. Numa situação normal, todas as cópias presentes na célula são idênticas, com uma sequência de mtDNA *wild-type*, situação designada então por “homoplasma normal”. Pelo contrário, na presença de cópias mutadas, tendo em conta que a distribuição das cópias é aleatória, podem originar-se diversas situações (Figura 7). As células filhas tanto podem apenas conter cópias normais de mtDNA (homoplasma normal), como podem conter as duas populações de mtDNA, normal e mutante, situação denominada por heteroplasma. Esta última pode existir em vários graus, dependendo da proporção de cópias normais/mutantes. Uma terceira situação a considerar é o caso de a célula apenas conter cópias mutantes do genoma mitocondrial – homoplasma mutante. A maioria das mutações patogénicas é considerada heteroplásmica, afetando apenas uma proporção do mtDNA celular (Pulkes e Hanna, 2001; Turnbull *et al.*, 2010).

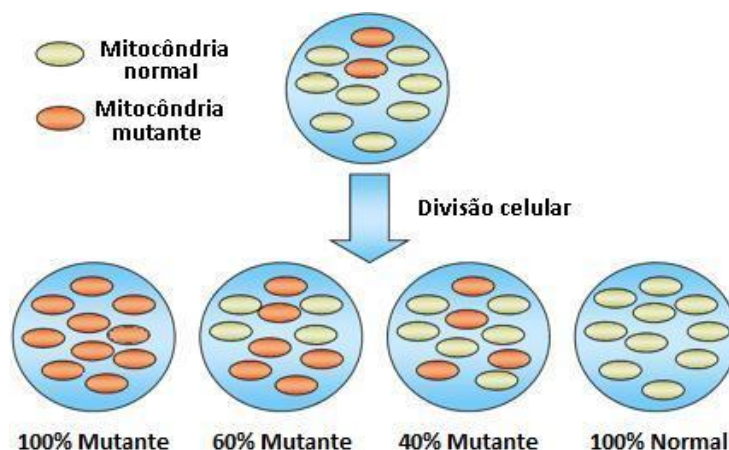


Figura 7 - Distribuição aleatória de mitocôndrias normais e mutantes; Homoplasma normal e mutante e diferentes graus de heteroplasma (adaptado de White, 2001).

### 1.3.6. Efeito limiar

Apesar dos erros que podem ocorrer nos processos de replicação e reparação do nDNA, pensa-se que as mutações sejam bastante mais frequentes em certos ambientes. Grande parte destas mutações não tem consequência, mas, ocasionalmente, daí resulta um mtDNA mutante replicativo. Porém, dado que existem múltiplas cópias de mtDNA em cada mitocôndria, tal não irá necessariamente, nem frequentemente, causar uma patologia. De facto, considera-se que existe um limiar de cópias mutadas a partir do qual surge um fenótipo associado às alterações no mtDNA, que se denomina limiar crítico. Vários autores referem que o limite a partir do qual se pode associar a mutação a disfunção mitocondrial num órgão ou tecido particular e doença mitocondrial, é a partir de 70% de mtDNA mutado (Figura 8), mas este número pode variar (DiMauro e Schon, 2008; McFarland e Turnbull, 2009).

Este efeito torna-se bastante complexo, uma vez que envolve uma variedade de fatores a ter em conta. Em primeiro lugar, deve ter-se atenção ao facto da distribuição do mtDNA nas células e tecidos ocorrer ao acaso, o que irá tornar imprevisível o grau de transmissão para a geração seguinte. Como consequência, a percentagem de mtDNA mutado poderá variar de tecido para tecido e até mesmo ao longo da vida. Seguidamente, a expressão das alterações do mtDNA depende do tipo de mutação em causa e da função que poderá comprometer, assim como do grau de heteroplasma desta

mutação e do tecido em causa, pois há tecidos com maior necessidade energética e, portanto, serão mais afetados (McFarland e Turnbull, 2009).

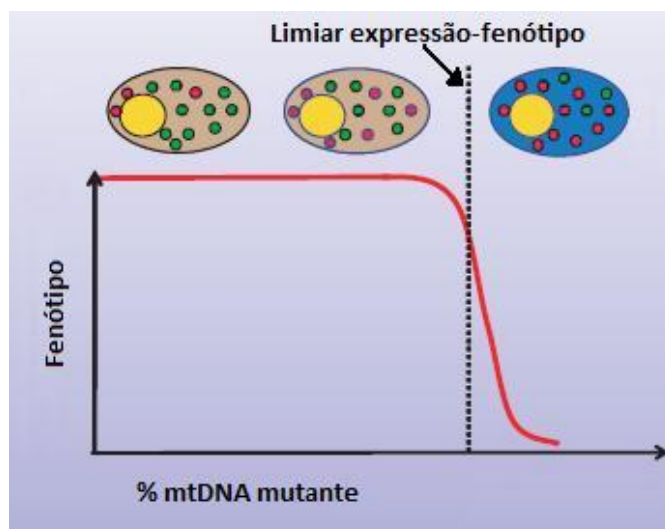


Figura 8 – Representação gráfica do efeito limiar (adaptado de McFarland e Turnbull, 2009).

#### 1.4. Disfunção mitocondrial e neurodegenerescência

Várias doenças hereditárias são causadas por mutações no mtDNA e os tipos celulares mais afetados nestas doenças são aqueles com maior necessidade energética, tal como o músculo e neurónios (Wallace, 2005). No entanto, as doenças neurodegenerativas mais comuns não são causadas diretamente por mutações mitocondriais, envolvendo, geralmente, interação mitocondrial com variáveis genéticas nucleares e ambientais (Mattson *et al.*, 2008).

Por um lado, existem as mutações primárias no genoma mitocondrial, que estão associadas a alguns tipos de doenças, como é o caso da mutação mais comum para a síndrome de MELAS (m.3243A>G) e da mutação m.8344A>G para a síndrome de MERRF. Outro caso a destacar é o da LHON, que tem associadas uma série de mutações comuns e que afetam primariamente o nervo ótico. Para além de substituições e deleções, existem também doenças mitocondriais nas quais se verifica um conteúdo reduzido de moléculas de mtDNA - depleção. Estes casos, ao contrário dos anteriores, não se destacam pelas mutações detetadas, mas pela redução do número de cópias de mtDNA (Spinazzola e

Zeviani, 2009). A acrescer a estes defeitos, que podem causar doenças mitocondriais, deve-se ainda considerar as alterações no nDNA, que codifica cerca de 1500 proteínas marcadas para a mitocôndria (Calvo *et al.*, 2006).

Por outro lado, a neurodegenerescência e os processos que a ligam à mitocôndria, envolvem diversos tipos de mecanismos. Têm sido propostas várias hipóteses para explicar como a mitocôndria pode ter influência nas diversas doenças neurodegenerativas. No que diz respeito a mutações no mtDNA, a função comprometida da CRM continua a ser um defeito bioquímico bastante comum nestas doenças. Apesar disso, cada vez mais têm sido publicados estudos com evidências de que o metabolismo do cálcio e da produção ROS alterados e a morte celular induzida pela apoptose, conduzem à disfunção e degenerescência neuronal (Turnbull *et al.*, 2010). De facto, os neurónios dependem da função mitocondrial e fornecimento de oxigénio, uma vez que o ATP é produzido pela OXPHOS, sendo necessários níveis bastante elevados de ATP para manter as funções neuronais normais: manter o transporte axonal de macromoléculas e organelos (como a mitocôndria), manter gradientes iónicos e o potencial membranar, transportar as vesículas sinápticas contendo os neurotransmissores e libertar neurotransmissores na fenda sináptica (Rugarli e Langer, 2012). Assim, qualquer anomalia a nível mitocondrial poderá ter como consequência um comprometimento destes processos.

As mitocôndrias são o local de produção de ATP, estando expostas a altas concentrações de ROS, que podem induzir alterações proteicas, oxidação lipídica e danos no mtDNA (Murphy *et al.*, 2011). A acumulação de mutações no mtDNA ocorre no envelhecimento normal, levando a danos oxidativos, causando falha energética e aumentando a produção de ROS, na forma de um ciclo vicioso (Figura 9). O cérebro é especialmente vulnerável ao dano oxidativo, devido ao seu alto conteúdo em ácidos gordos insaturados facilmente oxidáveis, consumo de oxigénio elevado e relativa escassez de enzimas antioxidantes, quando comparado com outros órgãos (Nunomura *et al.*, 2006). Além disso, as mitocôndrias estão estreitamente ligadas ao retículo endoplasmático e desempenham um papel essencial na homeostase intracelular do cálcio (Csordas *et al.*, 2010). Efetivamente, o *uptake* e libertação mitocondrial de cálcio regulam diversos processos, designadamente a produção de ATP, em que um excesso de cálcio pode conduzir à apoptose e morte celular (Giorgi *et al.*, 2008). A mitocôndria apresenta

capacidade de captar uma grande quantidade de cálcio do citosol rapidamente, devido a um elevado gradiente eletroquímico através da MMI. O cálcio é libertado lentamente para o espaço extracelular via  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ . Quando na presença de disfunção mitocondrial, esta pode ocorrer devido a um decréscimo do gradiente eletroquímico ou comprometimento das ATPases envolvidas no transporte deste ião (Turnbull *et al.*, 2010).

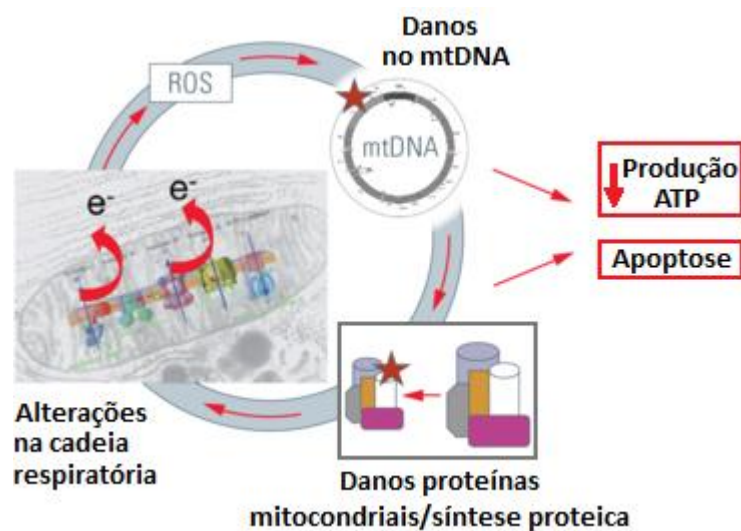


Figura 9 – Relação entre a produção de ROS e as alterações na mitocôndria como alvo (adaptado de <http://www.leica-microsystems.com/>).

É importante destacar ainda a relevância da mobilidade mitocondrial, ao nível dos neurónios. As mitocôndrias deslocam-se ao longo dos microtúbulos, movidas por proteínas motoras, as cinesinas (sentido axonal anterógrado) e as dineínas (sentido axonal retrógrado), que necessitam de ATP para exercer a sua função (Fichera *et al.*, 2004). Estes organelos são produzidos no corpo celular, transportados ao longo do neurónio, regressando novamente para o corpo celular para degradação. As mitocôndrias encontram-se distribuídas preferencialmente em dadas áreas, nomeadamente nos nós de Ranvier e nas sinapses, levando a que neurónios com maior atividade apresentem maior densidade de mitocôndrias (King e Stocco, 1996; Nguyen *et al.*, 1997). Foi sugerido que mutações nas proteínas motoras ou proteínas acessórias, assim como aglomerados proteicos que possam bloquear o transporte ao longo do axónio, podiam estar na base do

transporte mitocondrial comprometido e, conseqüentemente, do processo de degenerescência neuronal em algumas doenças neurodegenerativas (Chevalier-Larsen e Holzbaur, 2006).

#### **1.4.1. Citocromo C Oxidase**

As deficiências de atividade das enzimas que constituem a cadeia respiratória mitocondrial estão associadas a uma ampla variedade de doenças neurodegenerativas. De facto, ao longo do envelhecimento, podem desenvolver-se várias doenças degenerativas, maioritariamente causadas por stress oxidativo, resultando em acumulação de mutações do genoma mitocondrial e/ou nuclear, levando à apoptose. A disfunção mitocondrial causada por danos no mtDNA pode tornar as células cerebrais mais suscetíveis a danos oxidativos e, deste modo, proporcionar um mecanismo pelo qual fatores sistêmicos ou ambientais podem influenciar o decurso da doença (de la Monte, 2000; Grazina *et al.*, 2006).

A citocromo *c* oxidase (COX) (Figura 10) é o componente terminal da cadeia transportadora de eletrões e catalisa a sua transferência do citocromo *c* para o oxigénio. Esta enzima tem um peso molecular de 200 kDa e é composta por 13 subunidades, codificadas pelos genomas mitocondrial e nuclear. As três subunidades catalíticas da COX são codificadas pelo mtDNA, constituindo o centro catalítico da enzima, sendo as restantes subunidades, que rodeiam este centro, codificadas pelo nDNA (Diaz, 2010). A COX é ativa na forma de dímero e requer vários grupos prostéticos para exercer a sua função catalítica: 2 grupos heme ( $a$  e  $a_3$ ), 2 centros de cobre ( $Cu_A$  e  $Cu_B$ ), zinco e magnésio (Tsukihara *et al.*, 1996). A função catalítica relacionada com a reação redox é desempenhada pelas duas subunidades COX1 e COX2, enquanto a atividade de transporte de protões parece estar relacionada com a subunidade COX3 (Wilson *et al.*, 1990).



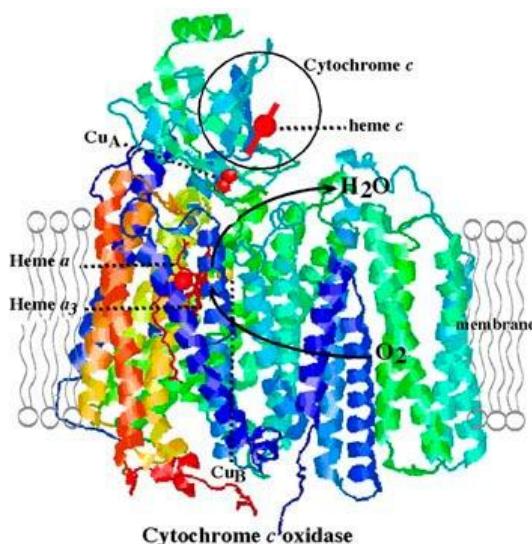


Figura 10 - Representação da enzima citocromo c oxidase (COX) ou complexo IV da CRM (<http://www.bmb.msu.edu/index.html>).

As deficiências bioquímicas a nível da COX podem derivar de mutações em qualquer uma das 3 subunidades codificadas pelo mtDNA, das 10 subunidades estruturais codificadas pelo nDNA ou dos fatores de *assembly*. Fenotipicamente, todas estas possibilidades podem levar ao aparecimento de uma ampla variedade de sintomas clínicos, que podem afetar um ou vários órgãos. A diferença na gravidade da deficiência e especificidade do tecido atingido parece estar relacionada com o grau de heteroplasmia da mutação do mtDNA e com o efeito limiar (Diaz, 2010).

Tsukihara e colaboradores (1996) elucidaram as funções catalíticas e regulatórias da COX. No que diz respeito à sua função catalítica, quatro eletrões são transportados via  $Cu_A$  e heme *a* para o oxigénio, o qual está ligado ao centro heme  $a_3-Cu_B$ . A reação encontra-se acoplada à translocação de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranar, formando assim o gradiente eletroquímico. Quanto às funções regulatórias, sabe-se que, em caso de um quociente elevado de ATP/ADP na matriz mitocondrial, o ADP é trocado por ATP e o número de prótons translocados decresce de quatro para dois (Arnold e Kadenbach, 1999). Mais recentemente, foram identificados vários locais nos quais pode ocorrer fosforilação em diferentes subunidades da COX, através da inibição alostérica por ATP. Com efeito, esta inibição parece ocorrer quando o quociente ATP/ADP é elevado, podendo ser revertida, isto é, a fosforilação é reversível. Como consequência, pensa-se que este mecanismo reduza o potencial membranar da

mitocôndria e, assim, possa levar à formação de ROS (Kadenbach, 2003; Helling *et al.*, 2008).

## **2. Objetivos**

---

As mutações a nível do mtDNA podem, de facto, estar na base de doenças neurodegenerativas. Para além de variados estudos comprovarem a relevância mitocondrial em diversos processos neurodegenerativos, também na DFT têm surgido evidências da importância da mitocôndria e do seu DNA. Foram reportadas várias alterações de nucleótido em doentes com DFT, tendo-se verificado, em alguns casos, uma redução na atividade dos complexos enzimáticos da CRM. Ao longo dos anos, o número de estudos na DFT tem vindo a aumentar consideravelmente, alargando o conhecimento da doença. De acordo com estudos publicados em doenças neurodegenerativas e com os desenvolvimentos recentes, pareceu importante considerar o papel do mtDNA na DFT. Assim, no sentido de aprofundar a investigação da relação do mtDNA com esta doença, foram objetivos do estudo:

- Proceder à sequenciação dos genes COX codificados pelo mtDNA em doentes de DFT;
- Analisar as variações de sequência dos genes alvo do estudo, para avaliação da contribuição das variações na etiopatogenia da DFT.

## **3. Material e Métodos**

### 3.1. Amostras biológicas

No presente trabalho, para cumprir os objetivos definidos, usaram-se amostras de DNA, previamente extraído de sangue periférico, no Laboratório de Bioquímica Genética (LBG) por métodos padronizados. A amostragem correspondeu a 70 doentes, 39 do sexo feminino e 31 do sexo masculino, entre os 38 e os 82 anos de idade, sendo a média de idade 63,1 anos, com um desvio padrão (dp) de 10,5. Os doentes apresentavam patologia correspondente a DFT ou síndromes com sobreposição com esta doença e foram seguidos e diagnosticados nas Consultas de Demências do Serviço de Neurologia do Hospital da Universidade de Coimbra (HUC). De acordo com este diagnóstico, os doentes deste estudo apresentavam as seguintes variantes clínicas: *vcDFT*, *APP*, *DCB* e *DS*. A Tabela 1 contém uma breve caracterização da amostragem, por sexo, idade, idade de início e história familiar, de acordo com o diagnóstico clínico.

Este estudo foi conduzido de acordo com as regras éticas e legais a serem seguidas em estudos genéticos.

Tabela 1 - Caracterização da amostragem de doentes utilizada neste estudo.

Diagnóstico	n	Sexo		Idade média (anos)	Idade média de início (anos)	História familiar		
		F	M			Positiva	Negativa	Desconhecida
<i>bvDFT</i>	60	34	26	64	61	22	36	2
<i>APP</i>	4	3	1	61	56	2	2	0
<i>DCB</i>	4	2	2	54	54	4	0	0
<i>DS</i>	2	0	2	50	47	0	2	0

### 3.2. Amplificação dos genes *MT-CO* por PCR

Para amplificação por PCR dos três genes mitocondriais que codificam subunidades da enzima citocromo *c* oxidase (*MT-CO1*, *MT-CO2* e *MT-CO3*) (Tabela 2) recorreu-se à sequência revista de referência de Cambridge do mtDNA humano, disponibilizada na base de dados (MITOMAP, 2012).

Tabela 2 - Localização dos genes *MT-CO* no mtDNA humano (Dados retirados de MITOMAP, 2012).

<i>Locus</i>	Início	Fim	Descrição
<i>MT-CO1</i>	5904	7445	Citocromo <i>c</i> oxidase - subunidade 1
<i>MT-CO2</i>	7586	8269	Citocromo <i>c</i> oxidase - subunidade 2
<i>MT-CO3</i>	9207	9990	Citocromo <i>c</i> oxidase - subunidade 3

A técnica de PCR é um procedimento eficaz para produzir grandes quantidades de uma sequência específica *in vitro*. Foi descrita pelo Dr. Kary Mullis, na década de 1980, que posteriormente ganhou o prémio Nobel da Química, em 1993, pela sua descoberta. Desde então, a técnica foi se tornando amplamente utilizada, devido à sua rapidez e relativa simplicidade. Além do mais, tem sido empregue para uma grande variedade de aplicações, que abrangem numerosas áreas, que podem ir desde a deteção de mutações à engenharia genética, passando por pesquisas nas áreas da medicina (Mullis *et al.*, 1986; McPherson e Moller, 2006).

De uma forma resumida, este processo de amplificação inicia-se com uma molécula de DNA usada como molde para produzir uma nova cadeia complementar, a partir da ligação de nucleótidos de forma complementar à cadeia inicial. Para que a replicação do DNA ocorra corretamente, são necessários vários componentes, nomeadamente *primers*. No que diz respeito à incorporação de nucleótidos de forma complementar à cadeia molde, esta função é desempenhada por uma DNA polimerase, que se liga à cadeia molde e adiciona nucleótidos, ao *primer*. Os *primers* são sequências de DNA sintéticas, com cerca de 20 nucleótidos, complementares à cadeia molde. Assim, quando o *primer* se liga, a enzima adiciona os nucleótidos à extremidade 3'-OH do *primer* (McPherson e Moller,

2006). Para a reação, para além do DNA molde, *primers* e DNA polimerase, são incluídos os quatro desoxi-nucleótidos trifosfato constituintes do DNA (dNTPs, N = A, C, G, T) e outros reagentes tais como  $Mg^{2+}$  ou DMSO, cuja função é estabilizar as cadeias de DNA e melhorar a ação da polimerase. O  $Mg^{2+}$  aumenta substancialmente a estabilidade da enzima e da cadeia de DNA, enquanto que o DMSO influencia a capacidade de ligação dos *primers* à cadeia molde, uma vez que diminui a interação *primer-primer* e *primer-molde* (Bej *et al.*, 1991; Charlieu, 1994).

A PCR compreende três etapas, relacionadas intimamente com uma alteração de temperaturas: a desnaturação, *annealing* e extensão (Figura 11). Estas etapas constituem um ciclo que se repete de forma sucessiva e que pode variar de 20 a 40 ciclos. Uma vez que nestas etapas se recorre a temperaturas bastante elevadas, é importante o uso de uma DNA polimerase termoestável, que resista a estas temperaturas. A mais frequentemente utilizada é a *Taq* DNA polimerase, assim denominada ser derivada da bactéria *Thermus aquaticus*, uma extremófila, encontrada em fontes hidrotermais (McPherson e Moller, 2006; Ramsden, 2009).

1ª Etapa - Desnaturação – O primeiro passo da amplificação é a desnaturação da cadeia de DNA da amostra, através do aumento da temperatura para cerca de 95°C, tipicamente 1 a 5 minutos;

2ª Etapa - Annealing – A temperatura da mistura é diminuída para aproximadamente 50-65°C. Neste passo, os primers ligam-se às sequências complementares de DNA, por ligações de hidrogénio. Esta fase tem uma duração de cerca de um minuto, variando a temperatura de acordo com a percentagem de bases GC da sequência a amplificar;

3ª Etapa - Extensão – A temperatura é cerca de 72°C, durante um minuto. Esta temperatura é adequada para a função catalítica ótima da *Taq* DNA polimerase, que inicia a síntese de DNA na extremidade 3'-OH de cada *primer* (Charlieu, 1994).

Deste modo, no primeiro ciclo da PCR, cada molde dá origem a duas cópias. Nos ciclos sucessivos, existirá então o dobro do número de cópias do DNA alvo, de forma a que, para uma eficiência de 100% na amplificação, o número de cópias obtido é  $2^n$ , sendo  $n$  o número de ciclos. Assim, para 20 ciclos existiriam  $2^{20}$  cópias do DNA alvo, isto é 1.048.572 cópias (McPherson e Moller, 2006).



Na preparação da mistura da reação de PCR, todos os componentes são misturados e distribuídos uniformemente para serem adicionados à amostra de DNA, garantindo que as quantidades dos componentes são distribuídas igualmente em todas as amostras e que o DNA é a única variável a ser investigada (Saiki, 1990).

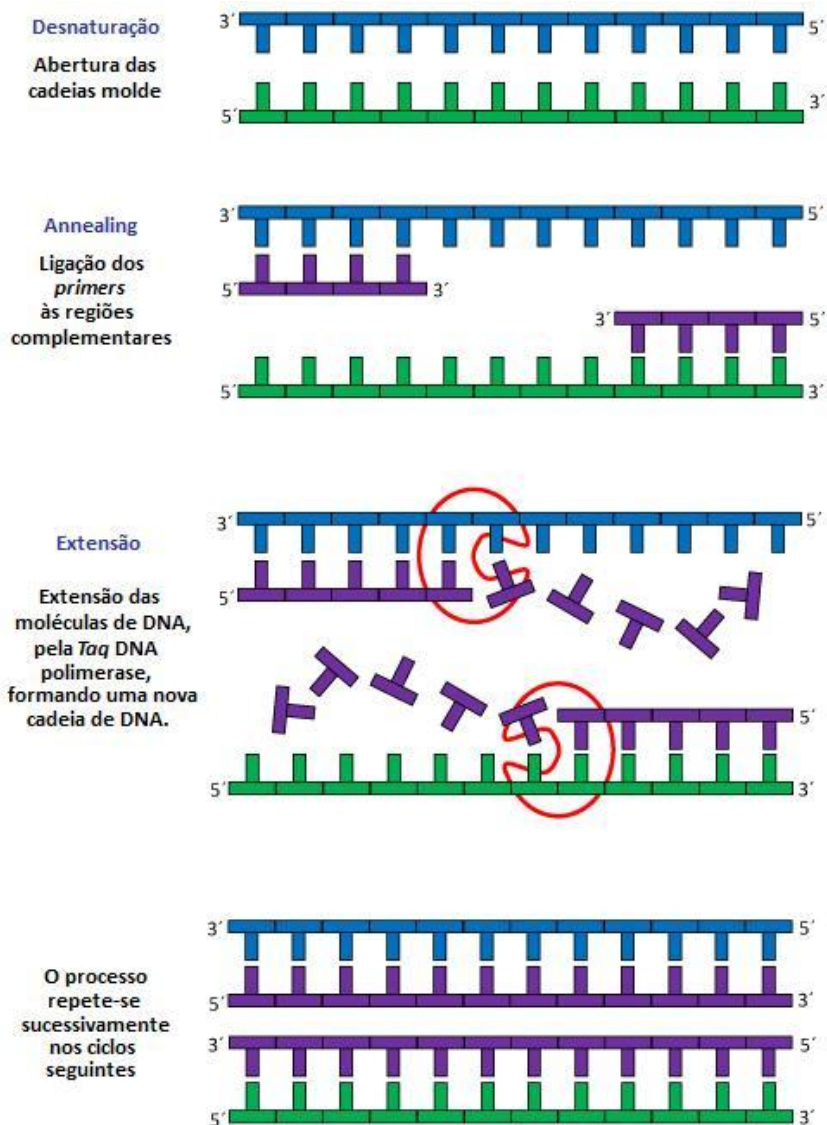


Figura 11 - Representa o esquem tica das fases da PCR (adaptado de <http://www2.le.ac.uk/departments/emfpu/genetics/explained/images/PCR-process.gif>).

Neste trabalho, a rea o de amplifica o foi realizada num volume total de 25  $\mu$ L. A mistura de PCR incluiu DNA (1ng/ $\mu$ L), *primers forward* e *reverse* (2,5  $\mu$ M), dNTPs (2mM), Taq DNA Polimerase (Fermentas) e respetivo tamp o (1x), MgCl<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O *milliQ*. Para

verificar a possibilidade de contaminação, foi incluído um controlo negativo, sem DNA, em cada reação da PCR. As características dos *primers* utilizados encontram-se resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados relativos aos *primers* usados na PCR (Landsverk *et al.*, 2012).

<i>Primer</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5' para 3')	Tamanho produto PCR (pb)
F	ACACTCATCGCCCTTACCA	734
R	TATGCGGGGAAACGCCATAT	
F	TCTACAACGTTATCGTCACAG	722
R	TAAATATATGGTGTGCTCACTC	
F	GAACCATTTGGATACATAGGTA	812
R	AAGTCATGGAGGCCATGGG	
F	ACACATTCGAAGAACCCGTA	808
R	TAGGACGATGGGCATGAAAC	
F	AACCACTTTCACCGCTACACG	839
R	ATGGTTTCGATAATAACTAGTATG	
F	GATTATAGGCTTTCGCTCTAA	834
R	AAGCAGTGCTTGAATTATTTGG	
F	ACACATCCGTATTACTCGCA	808
R	TATACCAATTCGGTTCAGTCT	

Legenda: F - *forward*; R - *reverse*.

Após adição da mistura às amostras de DNA, a preparação foi levada ao termociclador. Foi usado um programa de PCR com 35 ciclos (95°C, 45''; 50-60°C, 45''; 72°C, 1').

### 3.3. Eletroforese em gel de agarose

Os métodos mais simples e diretos para proceder à análise de produtos de PCR envolvem eletroforese em gel de agarose. O estudo da eletroforese de DNA teve início em 1964 e é um processo que permite separar e identificar, rápida e eficazmente, moléculas de DNA. O princípio da técnica baseia-se na migração de moléculas com carga sob a influência de um campo elétrico, na direção do eletrodo com carga oposta à da molécula. Durante o processo, de acordo com a carga e massa, as moléculas migram a diferentes velocidades, separando-se assim em frações distintas (Westermeier, 2005).

Dependendo do tamanho esperado do fragmento amplificado, é colocada uma parte do produto da reação num gel com uma percentagem de agarose que pode variar de 0,8 a 3%, corado com brometo de etídeo. A agarose é uma das substâncias mais utilizadas para fazer o gel e é constituída por um polissacarídeo de cadeia longa que é obtido a partir de uma alga (Stellwagen, 2009). Quanto ao brometo de etídeo, a sua função é intercalar-se entre as bases de DNA, formando um complexo brometo de etídeo-DNA. Quando este complexo é irradiado por luz UV, emite fluorescência laranja, que permite a visualização dos fragmentos de DNA. É importante realçar que o brometo de etídeo é mutagénico, sendo necessária especial atenção na utilização deste reagente. Em grande parte dos casos, uma percentagem de 1% de agarose dá uma resolução suficiente de fragmentos de DNA que apresentem 500 a 4000 pb (McPherson e Moller, 2006). À amostra é geralmente adicionada uma alíquota de *loading buffer*, que contém glicerol para conferir densidade à amostra e um marcador, como o azul de bromofenol, no sentido de seguir a migração das amostras no gel. A distância que a amostra percorreu a partir do ponto de aplicação, é comparada com a distância percorrida pelos fragmentos de tamanhos conhecidos de marcadores de peso molecular.

Neste trabalho, recorreu-se à eletroforese em gel de agarose, com o objetivo de confirmar a amplificação dos produtos de PCR. Os géis foram preparados com uma percentagem de agarose de 1%, nos quais foi adicionado, aquando da sua preparação, brometo de etídeo (0,1 mg/mL). Pipetou-se para o gel a amostra amplificada por PCR juntamente com *loading buffer* e o marcador de peso molecular utilizado foi o *PUC 8 MIX* (Fermentas). As voltagens para correr as amostras variaram entre os 100-140V, e o tempo de corrida entre os 40 e 70 minutos. O registo dos resultados em imagem foi efetuado

sob irradiação UV no transiluminador do equipamento *ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS* (Bio-Rad), usando o respetivo *software*.

### 3.4. Purificação dos produtos de PCR

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se um método de purificação que passa pelo uso de uma *mix* de duas enzimas hidrolíticas - a *ExoSAP-IT<sup>®</sup>* (Affimetrix<sup>®</sup>), composta pelas enzimas *exonuclease I* e *fosfatase alcalina*. O uso destas enzimas tem como objetivo a eliminação de substâncias não incorporadas durante a reação de amplificação. Cada uma delas tem, no entanto, um papel mais específico. A primeira degrada *primers* e restos de DNA de cadeia simples (ssDNA) inespecíficos (produzidos durante a PCR), e a segunda hidrolisa dNTP's (N = A, C, G, T) que ficaram livres e que podem prejudicar a reação de sequenciação (Werle *et al.*, 1994). Estas enzimas apresentam uma temperatura ideal de ação, que é de 37°C para a *Exonuclease I* e de 80°C para a *fosfatase alcalina*. Deste modo, após adição destas duas enzimas ao produto de PCR, leva-se esta mistura ao termociclador, de acordo com estas temperaturas. Neste trabalho, foi adicionado um volume de *mix* de 2 µL *ExoSAP<sup>®</sup>*/10 µL de produto por amostra, à temperatura de 37°C, com inativação a 80°C.

### 3.5. PCR de sequenciação e sequenciação automática

Nesta etapa, a reação que decorre é similar à PCR já descrita, apresentando, no entanto, algumas diferenças, nomeadamente o uso de apenas um *primer* (e não os dois primers - *forward* e *reverse*). À reação de sequenciação são adicionados: H<sub>2</sub>O *milliQ*, tampão de sequenciação, *primer* (*forward* ou *reverse*) e uma *mix* contendo nucleótidos livres (dNTPs), nucleótidos marcados com fluorescência (ddNTPs) e a enzima *Taq* DNA polimerase.

Durante esta reação, o *primer* liga-se à sequência complementar e os nucleótidos são incorporados de acordo com a cadeia molde. Neste passo, ocorre tanto a incorporação de dNTPs como de ddNTPs. Estes últimos são designados por nucleótidos de terminação,

pois cada vez que um deles é incorporado, a cópia da cadeia molde irá ser interrompida. Assim, irão ser produzidos fragmentos com diferentes tamanhos, que irão ser posteriormente lidos no processo de sequenciação (McPherson e Moller, 2006).

No presente estudo, para cada amostra preparou-se uma solução com volume final de 10  $\mu$ L, com de DNA purificado (1ng/ $\mu$ L), *primer* (2,5  $\mu$ M), *mix BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1* (Applied Biosystems<sup>™</sup>) e o respetivo tampão e H<sub>2</sub>O *milliQ*. Após preparação da mistura de reação a solução foi submetida num termociclador, num programa de 45 ciclos (96°C, 10''; 55°C, 5''; 60°C, 4').

Para proceder à sequenciação, é fundamental usar amostras de elevado grau de pureza. Assim, optou-se por se recorrer à purificação dos produtos de PCR de sequenciação por coluna de Sephadex. Este reagente foi descoberto em 1957 e a sua designação deriva do termo *Separation Pharmacia Dextran*, pelo facto da descoberta desta forma de separação pertencer à companhia *Pharmacia*. O fundamento da técnica baseia-se na separação de macromoléculas através da sua passagem por uma rede de dextrano, um polissacarídeo que, aquando da sua preparação, é hidratado (<http://www.gelifesciences.com/>). Desde a sua descoberta, foram desenvolvidos diversos produtos baseados no Sephadex para separação de biomoléculas.

Neste trabalho, usou-se uma preparação de Sephadex<sup>™</sup> (GE Healthcare Life Sciences) em H<sub>2</sub>O *milliQ*, submetida a centrifugação em coluna (2000xg). Posteriormente, todo o produto do PCR de sequenciação foi colocado na superfície da resina de Sephadex formada e levou-se a centrifugar nas mesmas condições, purificando assim o DNA.

O desenvolvimento dos métodos de sequenciação nos anos 70 representou um avanço importante nos estudos de DNA. A técnica de sequenciação automática é um processo rápido e automatizado, que permite determinar os nucleótidos que compõem a sequência de um fragmento de DNA, representando um dos processos finais na análise de DNA (Buitrago & Jimenez, 2001).

Os métodos de sequenciação mais utilizados são o de Maxam-Gilbert e o de Sanger-Coulson. Embora inicialmente o primeiro tenha sido muito utilizado, o segundo método é mais reprodutível, daí a sua maior utilização ao longo dos anos. Atualmente, as técnicas de sequenciação ainda utilizam o princípio básico deste método (Buitrago & Jimenez, 2001). O método de Sanger é o método de sequenciação mais comum e envolve a síntese *de novo* de uma série de cadeias simples de DNA, usando como molde a cadeia de DNA

que se pretende sequenciar (Sanger *et al.*, 1977). Tal como mencionado anteriormente, as cadeias sintetizadas são terminadas prematuramente, com vários tamanhos possíveis. A sequenciação automática baseia-se no princípio básico do método de Sanger e utiliza ddNTPs (didesoxinucleótidos trifosfato), terminais de reação marcados com fluorescência, o que evita a utilização de compostos radioativos. Cada ddNTP fluorescente constitui aproximadamente 1% da mistura de nucleótidos. A síntese começa no local de ligação do *primer* e termina por incorporação de nucleótidos terminadores, que não possuem o grupo hidroxilo na posição 3' da desoxirribose, impedindo assim o estabelecimento de ligações fosfodiéster. Consequentemente, a incorporação de nucleótidos na cadeia de DNA que está a ser sintetizada é interrompida. Deste modo, após desnaturação do fragmento de DNA, ocorre o emparelhamento do *primer* e a DNA polimerase é utilizada para sintetizar DNA a partir do molde. Quando um dos nucleótidos terminadores é incorporado, em vez do nucleótido normal, termina a síntese da cadeia. Na técnica clássica, os produtos resultantes das quatro reações são colocados em quatro poços adjacentes num gel de poliacrilamida, separados por electroforese, e visualizados por exposição do gel a uma película de raios X. A leitura do gel permite deduzir a sequência do fragmento de DNA (Buitrago & Jimenez, 2001; Videira, 2001).

As reações de polimerização produzem uma mistura de produtos fluorescentes de vários tamanhos (Strachan & Read, 2002). O maior avanço conseguido na técnica automática é a utilização do laser e programas informáticos específicos. Cada ddNTP marcado com fluorescência, quando excitado pelo laser, emite fluorescência em comprimentos de onda específicos para cada tipo de base associada. Assim, os quatro ddNTPs podem ser misturados na mesma reação e o equipamento deteta o sinal, que é depois analisado por programas específicos de bioinformática, com obtenção da sequência de DNA. As emissões provenientes dos diferentes fluoróforos, cada uma com um comprimento de onda diferente, resultam em diferentes espectros, que são interpretados pelo *software* de sequenciação e traduzidos num eletroferograma com quatro cores específicas para cada base (Buitrago & Jimenez, 2001; Videira, 2001) (Figura 12).

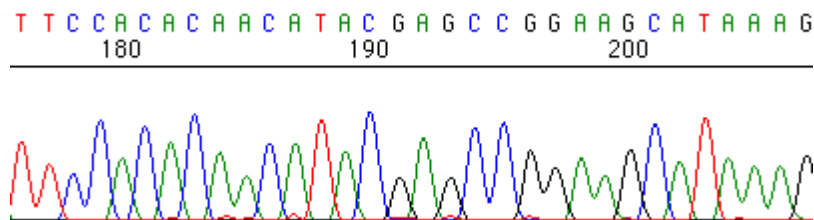


Figura 12 - Exemplo de uma sequência obtida através do processo de sequenciação automática (adaptado de [www.appliedbiosystems.com/](http://www.appliedbiosystems.com/)).

### 3.6. Análise das sequências obtidas

No final da sequenciação automática das amostras, as sequências foram analisadas recorrendo a dois *softwares* de análise, designadamente o *SeqScape v2.5* (Applied Biosystems) e o *Sequencing Analysis v5.4* (Applied Biosystems). A análise de alterações baseia-se na comparação com a sequência de referência. Deste modo, é possível detetar de um modo rápido e eficaz qualquer alteração de sequência da amostra.

### 3.7. Análise *in silico* das alterações detetadas

Do total das amostras em estudo, após serem analisadas individualmente todas as suas sequências, foi realizado o estudo *in silico* das alterações encontradas. Todas as variações de sequência foram analisadas numa base de dados MITOMAP (MITOMAP, 2012) e no programa *MitoAnalyser*, para obter a descrição da alteração encontrada, incluindo o aminoácido (caso haja alteração) e a sua posição na proteína.

No que diz respeito às substituições de nucleótido que conduziam a alteração de aminoácido, procedeu-se à sua análise recorrendo ao *software PolyPhen-2®* - *Polymorphism Phenotyping v2* (Adzhubei *et al.*, 2010). Trata-se de uma ferramenta automática utilizada para prever o possível impacto de uma substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína. Esta previsão baseia-se num número de características que inclui a sequência e a informação estrutural e filogenética, que caracteriza a substituição em causa. Esta análise foi complementada pela ferramenta *SIFT®* (*SIFT Aligned Sequences*), que também dá o mesmo tipo de previsão, esta com base num alinhamento de sequências inseridas pelo utilizador. A previsão baseia-se no grau de

conservação dos aminoácidos nos alinhamentos das sequências relativas a diferentes espécies (Ng e Henikoff, 2006). Foi também estudada a conservação evolutiva do aminoácido, relativamente às mesmas espécies inseridas na ferramenta *SIFT*<sup>®</sup>, usando a ferramenta de alinhamento de sequências *UniProt*<sup>®</sup>.



## **4. Resultados**

---

---

#### 4.1. Análise da sequência genética dos genes *MT-CO*

No que diz respeito à amplificação dos genes em estudo por PCR, encontra-se apresentada abaixo uma figura exemplificativa dos resultados obtidos (Figura 13).

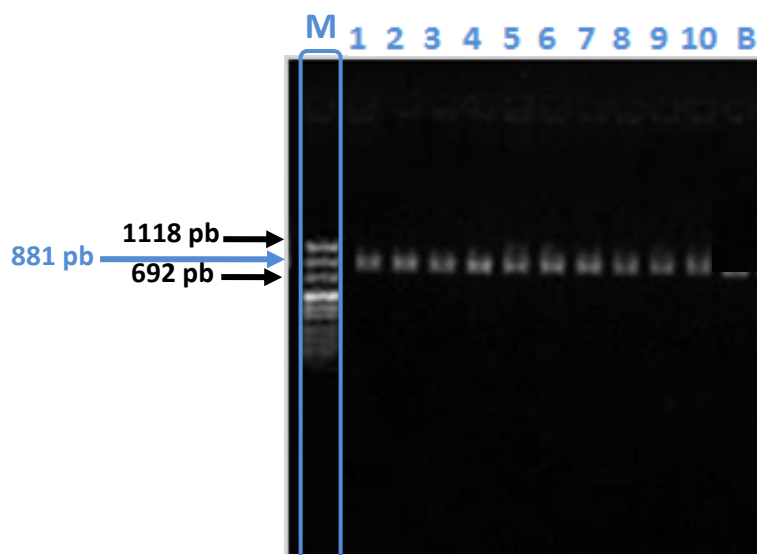


Figura 13 - Imagem de um dos géis de agarose obtida neste estudo para confirmação de amplificação por PCR. Legenda: M- Marcador de peso molecular (*PUC 8 MIX*, Fermentas); B - Controlo negativo; 1 a 10 – Amostras de DNA de doentes de DFT).

Após a amplificação das amostras, seguiu-se para os passos subsequentes, já descritos no Capítulo 3, até à obtenção das sequências genéticas. Na Figura 14 encontram-se dois exemplos de sequências obtidas pelo processo de sequenciação automática.

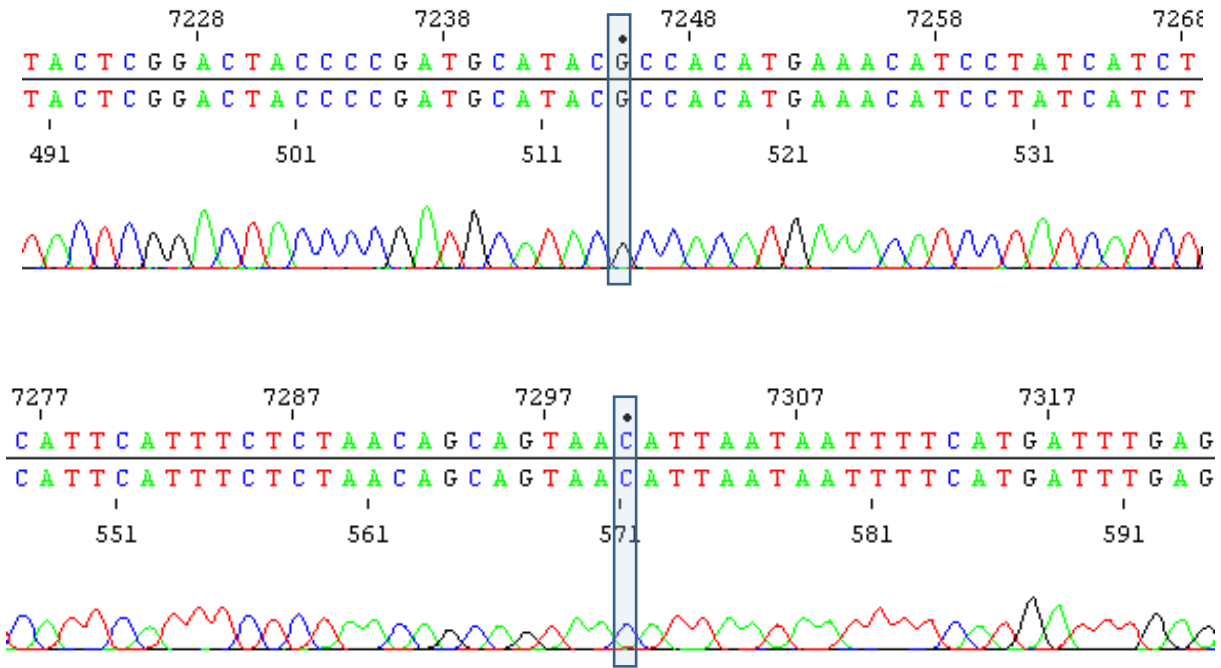


Figura 14 – Eletroferogramas que mostram as seqüências obtidas por sequenciação automática, com as alterações nas posições m.7245A>G (A) e m.7300T>C (B).

Analisando os resultados obtidos na generalidade, foram encontradas alterações em 56 (80%) dos 70 doentes estudados (Figura 15).

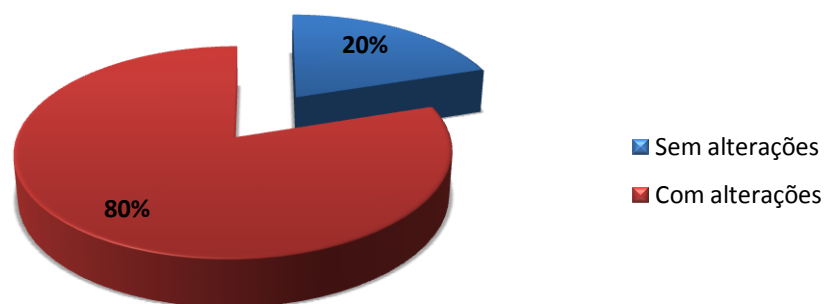


Figura 15 – Distribuição (%) do número de doentes (n=70) com e sem alterações detetadas no gene *MT-CO*.

Ao fazer uma análise das alterações detetadas no genes em estudo, repartidas pelas quatro variantes clínicas incluídas neste estudo (vcDFT, APP, DCB e DS) (Figura 16), verifica-se que, no global, existe um maior número de variações de sequência na subunidade COX1, em comparação com as subunidades COX2 e COX3.

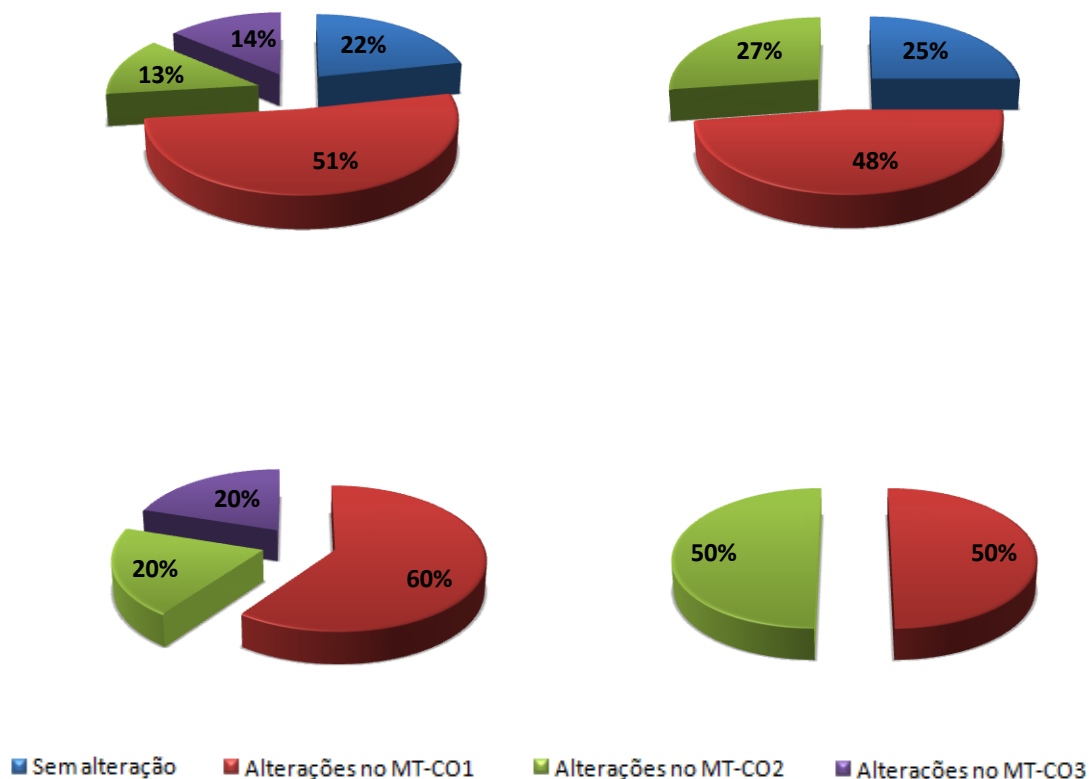


Figura 16 – Dados relativos à distribuição (%) das alterações detetadas nos doentes estudados para as diferentes variantes clínicas da DFT para os genes *MT-CO*: (A) - vcDFT (n= 60); (B) - APP (n=4); (C) - DCB (n=4); (D) - DS (n=2).

A informação relativa às variações de sequência detetadas no presente estudo foi organizada por alteração encontrada. Na Tabela 4 encontram-se descritas as alterações de acordo com os resultados da análise *in silico*. No caso de a alteração levar a alteração do aminoácido, utilizaram-se os softwares *Polyphen-2*<sup>®</sup> e *SIFT*<sup>®</sup> para avaliação da patogenicidade e o *UniProt*<sup>®</sup> para realizar o alinhamento das sequências para análise da conservação ao longo das espécies.

Tabela 4 – Variações de sequência detetadas nos genes *MT-CO* no presente estudo e respetiva descrição.

Alterações	Descrição (MITOMAP)	Locus	Aminoácido	Alteração de aminoácido	Posição do aminoácido no polipeptídeo	Tipo de mutação	Patogenicidade (PolyPhen-2® / SIFT®)
m.5913G>A	PRC/Substituição do mtDNA publicada em doença: cancro da próstata	<i>MT-CO1</i>	Asp	Asn	4 (514)	Missense	Benigna (0,000)/ Tolerada (0,690)
m.5999T>C	PRC/ Mutação somática no mtDNA reportada em linha celular de câncer do pâncreas	<i>MT-CO1</i>	Ala	Não	32 (514)	Sinónima	–
m.6032G>A	PRC	<i>MT-CO1</i>	Gln	Não	43 (514)	Sinónima	–
m.6047A>G	PRC/ Mutação somática no mtDNA reportada em linha celular de câncer do pâncreas	<i>MT-CO1</i>	Leu	Não	48 (514)	Sinónima	–
m.6146A>G	PRC/ Mutação somática no mtDNA reportada em linha celular de câncer do pâncreas	<i>MT-CO1</i>	Trp	Não	81 (514)	Sinónima	–
m.6221T>C	PRC	<i>MT-CO1</i>	Pro	Não	106 (514)	Sinónima	–
m.6242C>T	PRC	<i>MT-CO1</i>	Leu	Não	113 (514)	Sinónima	–
m.6272A>G	PRC	<i>MT-CO1</i>	Gly	Não	123 (514)	Sinónima	–
m.6293T>C	PRC	<i>MT-CO1</i>	Pro	Não	130 (514)	Sinónima	–

Investigação dos genes *MT-CO* na Demência Frontotemporal

Tabela 4 – Variações de sequência detetadas nos genes *MT-CO* no presente estudo e respetiva descrição (continuação).

m.6371C>T	PRC	<i>MT-CO1</i>	Ser	Não	156 (514)	Sinónima	–
m.6671T>C	PRC	<i>MT-CO1</i>	His	Não	256 (514)	Sinónima	–
m.6719T>C	PRC	<i>MT-CO1</i>	Gly	Não	272 (514)	Sinónima	–
m.6734G>A	PRC	<i>MT-CO1</i>	Met	Não	227 (514)	Sinónima	–
m.6755G>A	PRC	<i>MT-CO1</i>	Gly	Não	284 (514)	Sinónima	–
m.6773C>T	PRC	<i>MT-CO1</i>	His	Não	290 (514)	Sinónima	–
m.6776T>C	PRC/ Mutação somática no mtDNA descrita em massas mamárias quísticas	<i>MT-CO1</i>	His	Não	291 (514)	Sinónima	–
m.6899G>A	PRC	<i>MT-CO1</i>	Met	Não	332 (514)	Sinónima	–
m.6962G>A	PRC	<i>MT-CO1</i>	Leu	Não	353 (514)	Sinónima	–
m.7028C>T	PRC	<i>MT-CO1</i>	Ala	Não	375 (514)	Sinónima	–
m.7175T>C	PRC	<i>MT-CO1</i>	Thr	Não	424 (514)	Sinónima	–
m.7184A>G	PRC	<i>MT-CO1</i>	Pro	Não	427 (514)	Sinónima	–
m.7245A>G	PRC	<i>MT-CO1</i>	Thr	Ala	448 (514)	Missense	Possivelmente patogénica (0,940)/ Tolerada (0,100)

Investigação dos genes *MT-CO* na Demência Frontotemporal

Tabela 4 – Variações de sequência detetadas nos genes *MT-CO* no presente estudo e respetiva descrição (continuação).

m.7256C>T	PRC	<i>MT-CO1</i>	Asn	Não	451 (514)	Sinónima	–
m.7274C>T	PRC	<i>MT-CO1</i>	Gly	Não	457 (514)	Sinónima	–
m.7300T>C	Não descrita (nova)	<i>MT-CO1</i>	Met	Thr	466 (514)	<i>Missense</i>	Benigna (0,005)/Afeta a função (0,040)
m.7337C>T	PRC	<i>MT-CO1</i>	Ser	Não	478 (514)	Sinónima	–
m.7385A>G	PRC	<i>MT-CO1</i>	Thr	Não	495 (514)	Sinónima	–
m.7598G>A	PRC	<i>MT-CO2</i>	Ala	Thr	5 (228)	<i>Missense</i>	Benigna (0,000)/Tolerada (0,270)
m.7738T>C	PRC	<i>MT-CO2</i>	Thr	Não	51 (228)	Sinónima	–
m.7768A>G	PRC	<i>MT-CO2</i>	Met	Não	61 (228)	Sinónima	–
m.7771A>G	PRC	<i>MT-CO2</i>	Glu	Não	62 (228)	Sinónima	–
m.7805G>A	PRC	<i>MT-CO2</i>	Val	Ileu	74(228)	<i>Missense</i>	Benigna (0,000)/Tolerável (1,000)
m.7810C>T	PRC	<i>MT-CO2</i>	Leu	Não	75 (228)	Sinónima	–
m.7837T>C	PRC	<i>MT-CO2</i>	Leu	Não	84 (228)	Sinónima	–
m.7849C>T	PRC	<i>MT-CO2</i>	Asp	Não	88 (228)	Sinónima	–
m.7864C>T	PRC	<i>MT-CO2</i>	Pro	Não	93 (228)	Sinónima	–

Investigação dos genes *MT-CO* na Demência Frontotemporal

Tabela 4 – Variações de sequência detetadas nos genes *MT-CO* no presente estudo e respetiva descrição (continuação).

m.7975A>G	PRC	<i>MT-CO2</i>	Pro	Não	130 (228)	Sinónima	–
m.8020G>A	PRC	<i>MT-CO2</i>	Pro	Não	145 (228)	Sinónima	–
m.8158A>T	PRC	<i>MT-CO2</i>	Val	Não	191 (228)	Sinónima	–
m.8251G>A	PRC	<i>MT-CO2</i>	Gly	Não	222 (228)	Sinónima	–
m.8269G>A	PRC	<i>MT-CO2</i>	Codão de terminação	Não	228 (228)	Sinónima	–
m.9221A>G	PRC	<i>MT-CO3</i>	Ser	Não	5 (261)	Sinónima	–
m.9923C>T	PRC	<i>MT-CO3</i>	Ala	Não	239 (261)	Sinónima	–
m.9254A>G	PRC/ Mutação somática no mtDNA publicada em linha celular de cancro do pâncreas	<i>MT-CO3</i>	Trp	Não	16 (261)	Sinónima	–
m.9380G>A	PRC	<i>MT-CO3</i>	Trp	Não	58 (261)	Sinónima	–
m.9477A>G	PRC/ Mutação somática no mtDNA descrita em linha celular do cancro da tiróide	<i>MT-CO3</i>	Val	Ileu	91 (261)	Missense	Benigna (0,000)/ Tolerada (0,550)
m.9540T>C	PRC/ Mutação somática no mtDNA publicada em linha celular de cancro	<i>MT-CO3</i>	Leu	Não	112 (261)	Sinónima	–
m.9698T>C	PRC	<i>MT-CO3</i>	Leu	Não	164 (261)	Sinónima	–



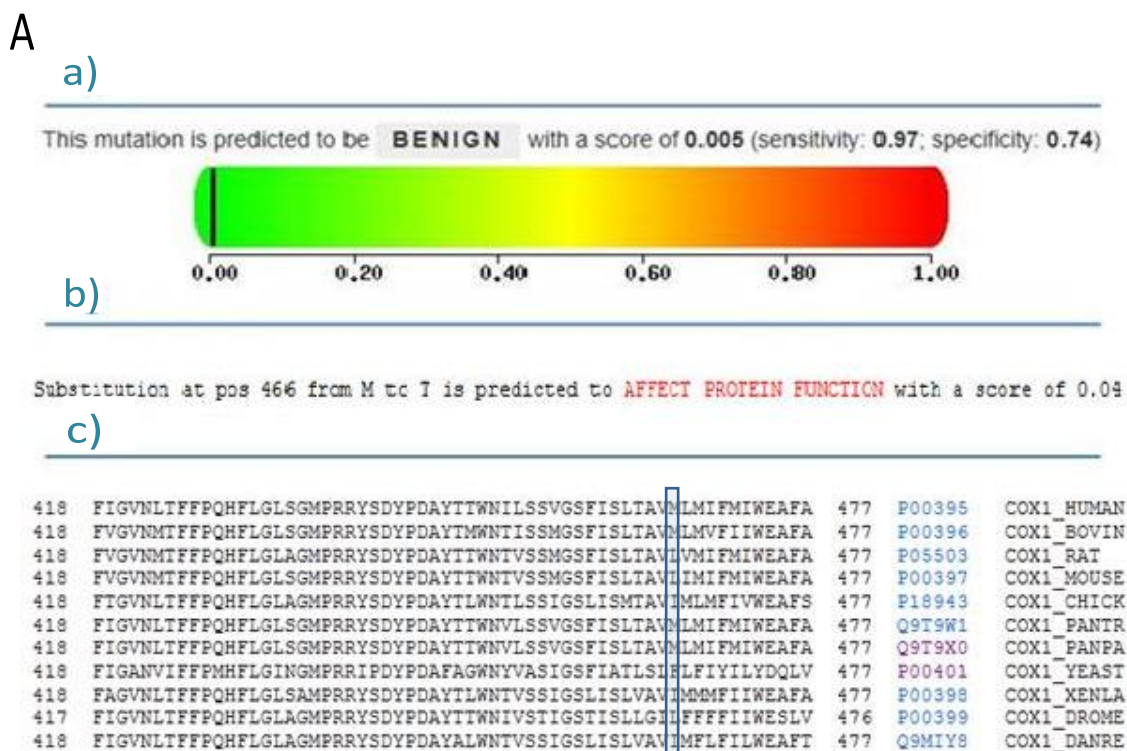
Investigação dos genes *MT-CO* na Demência Frontotemporal

Tabela 4 – Variações de sequência detetadas nos genes *MT-CO* no presente estudo e respetiva descrição (continuação).

m.9716T>C	PRC	<i>MT-CO3</i>	Gly	Não	170 (261)	Sinónima	–
m.9746G>A	Mutação somática no mtDNA descrita em linha celular do cancro da tiróide	<i>MT-CO3</i>	Glu	Não	180 (261)	Sinónima	–
m.9923C>T	PRC	<i>MT-CO3</i>	Ala	Não	239 (261)	Sinónima	–
m.9962G>A	PRC	<i>MT-CO3</i>	Leu	Não	252 (261)	Sinónima	–
m.9966G>A	PRC	<i>MT-CO3</i>	Val	Ileu	254 (261)	<i>Missense</i>	Benigna (0,000)/ Tolerada (0,430)
m.9977T>C	PRC	<i>MT-CO3</i>	Tyr	Não	257 (261)	Sinónima	–
m.9986G>A	PRC	<i>MT-CO3</i>	Gly	Não	260 (261)	Sinónima	–

É importante referir que os *scores* apresentados pelos dois *softwares* baseiam-se em escalas distintas. De facto, para ambos a escala varia entre 0,00 a 1,00. No entanto, para o *PolyPhen-2*<sup>®</sup>, o valor 0,00 corresponde a uma alteração considerada benigna e o valor de 1,00 corresponde a uma alteração considerada patogénica, pelo que à medida que a previsão se aproxima mais de 1,00 há maior probabilidade de a alteração ser considerada patogénica. Pelo contrário, a escala para o *SIFT*<sup>®</sup> é inversa, sendo que se prevê que a substituição afete a função da proteína para valores inferiores a 0,05 e que seja tolerada para valores superiores a 0,05. Tendo em conta a análise da patogenicidade apresentada na Tabela 4, apresentam-se os resultados na Figura 17, que correspondem às duas alterações com indicação de patogenicidade, sugeridos pelo *PolyPhen-2*<sup>®</sup> e *SIFT*<sup>®</sup>.

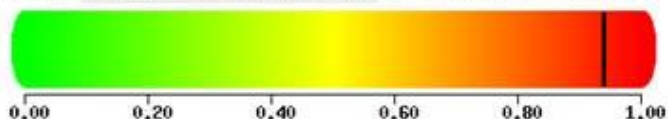
Relativamente à conservação do aminoácido correspondente às alterações, procedeu-se ao alinhamento das sequências recorrendo ao *UniProt*<sup>®</sup>, estando também apresentado na Figura 17.



B

a)

This mutation is predicted to be **POSSIBLY DAMAGING** with a score of **0.940** (sensitivity: **0.80**; specificity: **0.94**)



b)

Substitution at pos 448 from T to A is predicted to be TOLERATED with a score of 0.10

c)

418	FIGVNLTFPPQHFLGLSGMPRRYSYDPDAYT	WNLSSVGSFISLTAVMLMIFMIWEAFA	477	P00395	COX1_HUMAN
418	FVGVMITFFPQHFLGLSGMPRRYSYDPDAYT	WNTISSMGSFISLTAVMLMVFIIWEAFA	477	P00396	COX1_BOVIN
418	FVGVMITFFPQHFLGLAGMPRRYSYDPDAYT	WNTVSSMGSFISLTAVLVMIFMIWEAFA	477	P05503	COX1_RAT
418	FVGVMITFFPQHFLGLSGMPRRYSYDPDAYT	WNTVSSMGSFISLTAVLIMIFMIWEAFA	477	P00397	COX1_MOUSE
418	FTGVNLTFFPQHFLGLAGMPRRYSYDPDAYT	WNTLSSIGSLISMTAVIMLMFIVWEAFS	477	P18943	COX1_CHICK
418	FIGVNLTFPPQHFLGLSGMPRRYSYDPDAYT	WNLSSVGSFISLTAVMLMIFMIWEAFA	477	Q9T9W1	COX1_PANTR
418	FIGVNLTFPPQHFLGLSGMPRRYSYDPDAYT	WNLSSVGSFISLTAVMLMIFMIWEAFA	477	Q9T9X0	COX1_PANPA
418	FIGANVIFPPMHFLGINGMPRRIPDYPDAFA	WNYVASIGSFIATLSLFLFIYILYDQLV	477	P00401	COX1_YEAST
418	FAGVNLTFPPQHFLGLSAMPRRYSYDPDAYT	WNTVSSIGSLISLVAVIMMMFIIWEAFA	477	P00398	COX1_XENLA
417	FIGVNLTFPPQHFLGLAGMPRRYSYDPDAYT	WNIIVSTIGSTISLLGILFFFFIIVESLV	476	P00399	COX1_DROME
418	FIGVNLTFPPQHFLGLAGMPRRYSYDPDAYT	WNTVSSIGSLISLVAVIMFLFILWEAFT	477	Q9MIY8	COX1_DANRE

Figura 17 - Resultados da análise da patogenicidade e conservação evolutiva, relativos às alterações m.7300T>C (A) e m.7245A>G (B). a) - Previsão dada pelo *software Polyphen-2*<sup>®</sup>; b) - Resultado da previsão através da ferramenta *SIFT*<sup>®</sup>; c) - Alinhamento das sequências da proteína (*MT-CO1*) entre as posições 418 e 477 para análise da conservação do aminoácido em questão nas espécies apresentadas; Resultados apresentados de acordo com as sequências da proteína das espécies: Human- *Homo sapiens*; Bovin- *Bos taurus*; Rat- *Ratus Norvergicus*; Mouse- *Mus musculus*; Chick- *Gallus gallus*; Pantr- *Pan troglodytes*; Panpa- *Pan Paniscus*; Yeast- *Saccharomyces cerevisiae*; Xenla- *Xenopus laevis*; Drome- *Drosophila melanogaster*; Danre- *Danio rerio*.

## **5. Discussão**

---

---

As funções do sistema nervoso central estão intimamente relacionadas com a função mitocondrial, já que o tecido cerebral tem uma elevada necessidade energética. Existem diversos fatores que podem contribuir para a degenerescência, designadamente mutações no mtDNA, disfunção na dinâmica mitocondrial, produção de ROS e fatores ambientais (Filosto *et al.*, 2011). No presente estudo, procedeu-se à investigação de alterações do mtDNA, em particular dos genes que codificam as subunidades da COX, em 70 amostras de DNA provenientes de doentes com demência frontotemporal.

Efetivamente, a mitocôndria tem sido cada vez mais um alvo de estudo em doenças neurodegenerativas. A disfunção mitocondrial pode estar ligada à diminuição da formação de ATP, produção aumentada de ROS e também comprometimento do transporte de cálcio (Beal, 2005). O cérebro é especialmente vulnerável a danos oxidativos, existindo vários estudos evidenciando a associação entre mutações nos genes do mtDNA e nos genes envolvidos na manutenção deste genoma e um amplo espectro de doenças mitocondriais que afetam o cérebro. Além do mais, foram identificadas mutações no mtDNA e nos genes relacionados em doenças neurodegenerativas, associadas a demência. Em alguns estudos, foram descritas mutações patogénicas em doentes com demência e disfunção cognitiva (Spinazzola e Zeviani, 2005; Finsterer, 2009). Assim, cada vez mais tem sido destacada a importância da mitocôndria e do mtDNA em processos neurodegenerativos, nomeadamente na doença de Alzheimer (Grazina *et al.*, 2006).

Ao longo do tempo, a DFT começou a ser mais investigada, parecendo existir a hipótese de, também nesta doença neurodegenerativa, estar implicado um papel mitocondrial e do seu genoma. Em 1995, Chang *et al.* descreveram um doente com DFT e DNM com alterações a nível neuronal, tendo colocado a hipótese de uma relação com disfunção mitocondrial ou tráfego mitocondrial alterado. Mais tarde, Grazina *et al.* (2004) identificaram uma alteração no mtDNA numa subunidade do complexo I, resultando numa alteração de aminoácido na proteína em questão. Estando as mutações no mtDNA ligadas a comprometimento da atividade dos complexos enzimáticos da CRM, torna-se importante investigar a importância do mtDNA na demência frontotemporal. Para além desta possível relação com a neurodegenerescência, é de ter em conta a correlação com a produção de ROS e a relevância da mitocôndria nas células do sistema nervoso.

Assim, é relevante analisar as alterações ao nível do mtDNA que apresentamos, tendo-se recorrido à sequenciação, uma técnica eficaz na identificação de mutações (McFarland e Turnbull, 2008). Esta análise foi acompanhada por uma análise *in silico*, essencial para o estudo das alterações de aminoácido, resultantes de uma alteração no DNA. Neste trabalho, foram usadas as ferramentas bioinformáticas *PolyPhen-2*<sup>®</sup> e *SIFT*<sup>®</sup>. Ambos são utilizados com o objetivo de se obter uma previsão do efeito de mutações na função e/ou estrutura de uma dada proteína. O primeiro abrange mais fatores em comparação com o segundo, e tem em conta oito características baseadas na sequência e três características relacionadas com a estrutura. A maioria destes fatores envolve a comparação de propriedades *wild-type* (ancestrais, normais) com a propriedade correspondente resultante da mutação. Para tal, é selecionado um conjunto de sequências homólogas que são posteriormente alinhadas. Relativamente ao *SIFT*<sup>®</sup>, a previsão é fornecida com base na homologia entre sequências, de espécies inseridas pelo utilizador, sendo dado um *score* fundamentado na posição em causa nessas sequências. Esta ferramenta baseia-se na premissa de que os aminoácidos importantes serão conservados numa família de proteínas, pelo que alterações em aminoácidos conservados deverão alterar a função da proteína. Assim, quando se inserem as sequências, o *SIFT*<sup>®</sup> faz uma comparação entre elas e, com base nos aminoácidos em cada posição e na sua importância, dá uma previsão sobre se afetará a função da proteína (Ng e Henikoff, 2002). As mesmas sequências foram inseridas na ferramenta de alinhamento *UniProt*<sup>®</sup>, com o objetivo de obter o alinhamento das sequências utilizado pelo *SIFT*<sup>®</sup>, para analisar a conservação do aminoácido ao longo das espécies. De acordo com Ng e Henikoff (2006), estes estudos fornecem uma perceção das diferenças observadas entre as espécies. É ainda de referir que o *Polyphen-2*<sup>®</sup> e *SIFT*<sup>®</sup> consideram, na sua análise, várias bases de dados nas quais se encontram informações de alterações descritas.

Ao analisarmos a distribuição das alterações identificadas no presente estudo (Figura 15), verifica-se que há uma grande maioria de doentes de DFT com alterações nos genes *MT-CO*, em que 80% dos doentes têm uma ou mais alterações. No total, foram encontradas 55 variações diferentes (Tabela 4), das quais 7 levam a alteração de aminoácido na proteína em estudo. Na análise por variante da DFT, observa-se que 22% dos doentes com a variante comportamental não apresentam qualquer variação nos

genes em estudo. De entre os que possuem alterações, a maioria localiza-se no gene *MT-CO1* (51%), em comparação com os que afetam as subunidades 2 (13%) e 3 (14%). Deste modo, nota-se que para a vcDFT há um maior número de alterações para o *MT-CO1* em relação aos outros dois genes. Tendo em conta que a COX1 tem 514, a COX2 228 e a COX3 261 aminoácidos, seria de esperar que se encontrassem maior número de variações na primeira, comparando com as subunidades 2 e 3, tal como observámos. Relativamente aos doentes com APP, 25% não apresenta alterações, sendo os restantes 75% distribuídos entre alterações no *MT-CO1* (48%) e *MT-CO3* (27%). Nos doentes com DCB, todos apresentavam alterações, com 60% no *MT-CO1*, e 20% na *MT-CO2* e *MT-CO3*. Por último, para os doentes com DS, 50% das alterações foi encontrada no *MT-CO1* e 50% no *MT-CO2*. Torna-se relevante referir que para as variantes APP (n=4), DCB (n=4) e DS (n=2) o número de doentes é bastante inferior quando comparado com o número de doentes com vcDFT (n=60), o que pode ter, de facto, influência nas distribuições observadas, que serão assim mais consistentes para a vcDFT do que para as três variantes referidas. No entanto, este número de doentes também reflete o facto de a vcDFT ser a variante mais comum da DFT.

### 5.1. Análise *in silico* das alterações

Quando se deteta uma alteração na sequência genética, é necessário estabelecer se se trata de um polimorfismo ou de uma mutação patogénica (Wong e Boles, 2005). Efetivamente, as mutações no mtDNA são muito frequentes na população em comparação com mutações no nDNA, pelo que o mtDNA tem a ele associado um grande número de alterações de bases neutras, que não têm significado patogénico aparente (Wallace *et al.*, 1999). Estes dados vão ao encontro do que se observa na análise dos resultados deste estudo, que revelam um número considerável de polimorfismos (PRC – polimorfismos em regiões codificantes). Alguns destes polimorfismos, para além de estarem descritos como tal, foram também descritos como mutações somáticas no mtDNA em determinadas linhas celulares ou como substituições descritas em doenças. Nestes casos em particular (Tabela 4), as alterações foram identificadas em linhas celulares tumorais do pâncreas, massas mamárias quísticas ou cancro da tiróide ou em

casos de doentes com cancro da próstata. Após análise de dados clínicos adicionais dos doentes, verificou-se que alguns deles apresentavam patologia na próstata, hiperplasia benigna da próstata (HBP), ou patologia tiroideia. No entanto, nenhum doente com estas características clínicas apresenta alguma das alterações correspondentes. Nenhum dos doentes em estudo apresenta patologia relacionada com pâncreas ou massas mamárias.

De entre as alterações nucleotídicas detetadas ao longo deste estudo, algumas delas conduziam a alteração de aminoácido. Foram encontradas 7 alterações de aminoácidos, correspondentes quer a polimorfismos, mutações publicadas ou a alterações novas. No que diz respeito à alteração m.5913G>A, de acordo com as bases de dados consultadas, foi descrita como um PRC e como uma substituição reportada em cancro da próstata. De acordo com o trabalho de Petros e colaboradores (2004), esta substituição faz parte de um grupo de alterações que, no conjunto, podem aumentar a predisposição para o cancro da próstata. Esta alteração foi encontrada em apenas um doente, do sexo feminino com APP. Uma vez que se trata de uma doente do sexo feminino, não surgiu a necessidade de analisar a relação com a mutação publicada e os seus dados clínicos, não constando referência a qualquer tipo de tumor. A substituição referida leva a alteração de aminoácido na proteína, mais especificamente de aspartato para asparagina, ambos aminoácidos polares, pelo que, nesse aspeto, não se esperaria que a função da proteína sofresse muitas alterações. As previsões dadas pelo *Polyphen-2*<sup>®</sup> e *SIFT*<sup>®</sup> mostram que a alteração é benigna, sendo os resultados concordantes entre si. Nesta doente foi ainda detetado um polimorfismo – m.7028C>T.

A substituição m.7245A>G, por sua vez, é possivelmente patogénica, de acordo com a previsão dada pelo *Polyphen-2*<sup>®</sup> e tolerada, tendo em conta o resultado da análise do *SIFT*<sup>®</sup>. De facto, há uma alteração de aminoácido de treonina para alanina, ou seja, de um aminoácido polar para um apolar. As proteínas diferem entre si pelo número, tipo e sequência de aminoácidos, que definem a sua estrutura primária. Assim, uma alteração na sequência de aminoácidos poderá alterar a estrutura da proteína e, conseqüentemente, a sua função. Segundo o *Polyphen-2*<sup>®</sup>, a alteração é possivelmente patogénica. Este considera, na sua análise, a conservação da sequência e a estrutura de acordo com a posição do aminoácido. No entanto é de notar que as sequências que o *software* considera não são escolhidas pelo utilizador, mas sequências homólogas



consideradas pelo próprio sistema. Estas sequências são de primatas, enquanto que as sequências utilizadas no *SIFT*<sup>®</sup> e *UniProt*<sup>®</sup> abrangem uma variedade mais ampla de espécies, embora tendo em conta um menor número de variáveis. Deste modo, tendo em conta estes fatores, esta pode ser uma possível razão para explicar a diferença de resultados quanto a esta alteração, uma vez que o *Polyphen-2*<sup>®</sup> mostra uma conservação do aminoácido em causa, ao contrário do *SIFT*<sup>®</sup>, no qual se observa um menor grau de conservação (com as sequências das espécies referidas na Figura 17). Esta alteração está descrita como PRC e apenas foi encontrada num doente, com vcDFT. Esta alteração foi descrita como PRC num estudo de Pello e colaboradores (2008), em controlos para investigação da OXPHOS na LHON.

A substituição m.7300T>C foi considerada benigna pelo *Polyphen-2*<sup>®</sup>, ao passo que o *SIFT*<sup>®</sup> prevê que a alteração afete a função da proteína, ao contrário do caso anterior. Esta encontra-se também em apenas um doente, para o qual foram detetados também dois polimorfismos (m.7028C>T e m.7598G>A). No que toca à alteração de aminoácido, resulta numa alteração de metionina (apolar) para treonina (polar). Mais uma vez, verifica-se discordância em relação às previsões dadas pelas ferramentas usadas. De facto, esta diferença pode estar novamente relacionada com as sequências nas quais os dois programas se baseiam, tal como explicado anteriormente. Após a observação das sequências usadas pelo *Polyphen-2*<sup>®</sup>, concluiu-se que o nível de conservação do aminoácido nas espécies que este tem em conta é bastante baixo, o que se pode refletir na previsão dada. Apesar da alteração levar à substituição de um aminoácido, por outro com características muito diferentes, este *software* baseia-se num número maior de variáveis relacionadas com as sequências do que da estrutura, podendo assim levar ao resultado de que a alteração é benigna. Observando as sequências consideradas para a previsão através do *SIFT*<sup>®</sup>, há uma maior conservação do aminoácido entre as espécies consideradas, especialmente entre as espécies filogeneticamente mais próximas. Isto pode levar ao resultado obtido, sendo o valor bastante próximo de 0,05, a partir do qual o *software* considera que a alteração é tolerada a nível da proteína. Esta alteração não se encontra descrita nas bases de dados, tratando-se assim de uma nova alteração. Os nossos resultados evidenciam também as limitações das ferramentas bioinformáticas, devendo utilizar-se mais do que um tipo de *software* para uma análise mais completa.

No que diz respeito a alterações no gene *MT-CO2*, foi identificada a substituição m.7598G>A, resultando numa alteração de aminoácido, de alanina (apolar) para treonina (polar). Observa-se que, em ambos os *softwares*, a conservação do aminoácido é baixa, sendo concordantes as previsões dadas pelos dois programas - benigna/tolerada. Esta substituição encontra-se descrita como polimorfismo e foi detetada em apenas um doente. A substituição m.7805G>A também evidencia uma previsão semelhante a anterior, estando também descrita como polimorfismo e foi encontrada em dois doentes. Um dos doentes apresenta a vcDFT, ao passo que o outro tem SCB.

Já relativamente a alterações no gene *MT-CO3*, detetaram-se duas substituições, m.9477A>G e m.9966G>A, que conduzem a alteração de aminoácido, ambas de valina para isoleucina, apolares. A primeira foi encontrada em dois doentes (com diferentes variantes clínicas) e a segunda num doente. As previsões dadas pelos dois *softwares* utilizados são concordantes. Estas duas substituições foram descritas em linhas celulares de cancro da tiróide. Porém, para nenhum dos dois doentes está descrito qualquer tipo de patologia relacionada.

## 5.2. Análise geral das variações detetadas

Sabe-se que as mutações no mtDNA podem estar relacionadas com um declínio progressivo da função normal de alguns tecidos. As mutações ao nível do genoma mitocondrial estão primariamente ligadas a defeitos bioenergéticos, que estão na base de diferentes doenças neurodegenerativas (Grazina *et al.*, 2006). De entre diversas doenças neurodegenerativas, observa-se, efetivamente, sobreposição clínica e/ou neuropatológica. Este é o caso da doença de Alzheimer (DA) e da DFT (Grazina *et al.*, 2004).

Tendo em conta a literatura, é possível reunir vários estudos que se debruçaram sobre a análise do mtDNA na DA (Grazina *et al.*, 2006). Foram descritas alterações em diversas regiões do mtDNA em doentes de Alzheimer, nomeadamente na região D-LOOP, rRNA, tRNA, nas subunidades ND1 e ND2 do complexo I e ainda na subunidade CO2 do complexo IV. No que diz respeito a alterações no complexo IV, Qiu *et al.* (2001) encontraram as alterações m.8206G>T e m.8224A>T. No entanto, neste estudo não foi

avaliada a atividade da COX, o que seria importante. Porém, um ano mais tarde, foi publicado outro estudo de alterações no mtDNA em doentes de Alzheimer, a partir do qual se observou que existia uma correlação entre o nível de mutações pontuais somáticas e o decréscimo da atividade da COX (Lin *et al.*, 2002).

Em 2004, Grazina e colaboradores consideraram a possibilidade de o mtDNA ser um fator a ter em conta quer na DA, quer na DFT. Nesse trabalho, foram detetadas alterações, uma ainda não publicadada e uma já conhecida, no gene que codifica a subunidade 1 do complexo I, num doente com DFT. As duas alterações conduziam a alteração de aminoácido. Reforçando os resultados obtidos no trabalho, os autores observaram também uma redução de 64% da atividade do complexo enzimático.

Em 2006, e ainda no que diz respeito à DA, um grupo publicou algumas alterações encontradas no mtDNA, mais especificamente na COX. Três delas eram alterações *missense*, nos genes *MT-CO3*, entre as quais uma nova variação, m.9861T>C. O facto de se tratar de uma alteração na posição de um aminoácido conservado levou a equipa a procura-la em mais doentes, tendo sido encontrada em mais um. Além do mais, nestes dois doentes verificou-se uma atividade reduzida da COX, com uma redução de cerca de 80%, em comparação com controlos (Hamblet *et al.*, 2006). As outras duas variações incluíam as alterações nas posições 9599 e 9477 do mtDNA, tendo esta última sido também detetada em três doentes no presente trabalho. De acordo com os autores do estudo anteriormente referido, a alteração m.9477A>G é uma alteração bastante comum. Da análise dos nossos resultados, é possível observar que algumas das alterações identificadas são comuns às descritas para a DA (Hamblet *et al.*, 2006), nomeadamente m.1974C>T, m.1977C>T, m.3988C>T (gene *MT-CO1*) e m.3929T>C, m.1739T>C, m.1816T>C (gene *MT-CO3*).

Ao observarmos mais atentamente as alterações, notámos que a alteração m.7028C>T se encontra num número considerável de doentes, designadamente em 37. De acordo com as frequências de haplotipo estimadas pelo Mitomap, os haplotipos mais comuns nas populações do Oeste da Europa são o H (41%) e o U (18%). Ainda nesta base de dados, é possível consultar alterações marcadoras de haplogrupos, sendo que para o haplogrupo H é apresentada a posição 7028, com o nucleótido original (C). Verifica-se que, efetivamente, no haplogrupo H predomina o nucleótido de acordo com a sequência

original, tendo-se observado que a alteração m.7028C>T é marcadora de outros haplogrupos existentes na Europa para além do H, nomeadamente o U (18%), J (9%), T (8%), V (7%) ou K (5%) (Jiang *et al.*, 2004; van der Walt *et al.*, 2004). Desta forma, esta pode ser uma razão pela qual esta alteração foi encontrada com elevada frequência na população estudada.

Apesar de grandes esforços para elucidar os mecanismos patológicos específicos que conduzem a perda celular, nomeadamente na neurodegenerescência relacionada com a mitocôndria, os conhecimentos atuais permanecem limitados. O defeito bioquímico mais comum continua a ser o comprometimento da CRM e, portanto, a produção de ATP. No geral, as variações detetadas neste estudo consistem em polimorfismos, na sua grande maioria. Tal como noutros estudos da literatura, questiona-se quantas alterações diferentes poderão estar relacionadas com fenótipos distintos, mesmo tratando-se de alterações envolvendo o mesmo complexo enzimático. Apesar de grande parte das alterações encontradas serem polimorfismos, não se deve excluir a possibilidade de estarem envolvidos na etiopatogenia da DFT, juntamente com outras alterações, quer em outros genes mitocondriais, quer em nucleares, sem esquecer fatores externos/ambientais. Além do mais, parece relevante o facto de se terem descoberto alterações já descritas na DA, que tem sobreposição clínica e neuropatológica com a doença em estudo, embora não se tenha provado que, por si só, estas alterações conduzam à doença. No sentido de reforçar os dados obtidos neste trabalho seria então importante proceder a mais estudos, para compreender a possível existência de uma relação, não só dos genes *MT-CO* como de outros genes mitocondriais não estudados, com a DFT.

É relevante realçar a hipótese de um conjunto de alterações, que, isoladamente, não são patogénicas, poderem condicionar a disfunção da CRM, com eventuais efeitos na idade de início da doença ou na interação com outros fatores genéticos nucleares (Grazina *et al.*, 2006).

## **6. Conclusões e perspectivas futuras**

---

---

As mutações ao nível do mtDNA podem estar relacionadas com várias alterações fenotípicas, que podem incluir uma alteração funcional da CRM, podendo ainda influenciar muitas outras funções celulares. Adicionalmente, existe uma diversidade de características a considerar quando se está a trabalhar com mtDNA, nomeadamente a sua elevada taxa de mutações, relacionada com a ausência de histonas e sistema de reparação menos eficiente, em comparação com o nDNA (Grazina *et al.*, 2004). Dada esta vulnerabilidade, podem ocorrer danos oxidativos no mtDNA, em especial com o aumento da idade e nas doenças neurodegenerativas. Todos estes dados tornam a interpretação de resultados mais complexa.

De facto, as variações polimórficas nas subunidades da CRM podem determinar a sua eficiência e a produção de ROS, que se correlacionam com alterações no mtDNA. Além disso, as mutações somáticas no mtDNA conduzem à redução da eficiência da CRM, podendo levar à disfunção da OXPHOS e/ou produção de ROS aumentada. As alterações no mtDNA podem ter influência na idade de início de uma dada doença, contribuindo para o processo neurodegenerativo, que pode estar relacionado com o comprometimento da CRM (Grazina *et al.*, 2006). Não se deve ainda esquecer a relevância de fatores ambientais, que contribui para uma maior dificuldade em estabelecer uma relação genotípica e fenotípica (Gosh *et al.*, 1999).

Apesar de o conhecimento da DFT ter vindo a aumentar consideravelmente, os estudos que tentam compreender uma possível relação da importância do mtDNA na doença são bastante escassos. No presente estudo, foi encontrado um número considerável de alterações, maioritariamente polimorfismos. Foi encontrada uma nova alteração que não se encontrava descrita na literatura. Neste aspeto, é relevante mencionar a importância das diferentes ferramentas às quais se pode recorrer para obter diferentes tipos de previsões. No conjunto, estas alterações que codificam polipeptídeos ao nível das subunidades do complexo IV podem estar relacionadas com a alteração da sua atividade, pelo que podem estar envolvidas na etiopatogenia da DFT. Nesse sentido, seria importante analisar a atividade deste complexo enzimático, para complementar estes dados. Por outro lado, estas alterações podem estar associadas a outras mutações, quer mitocondriais, quer nucleares. De acordo com diversos estudos, as mutações no

mtDNA pode também ter um efeito cumulativo, aumentando a probabilidade de desenvolver uma falha no funcionamento da CRM.

Para complementar o presente estudo, seria essencial verificar a ausência das alterações identificadas, em particular as que têm previsão de que podem ser patogénicas, confirmar que permanecem ao nível do mRNA e realizar estudos de expressão. Estes permitiriam analisar os níveis dos polipeptídeos em causa (por *western blotting*) e, eventualmente, investigar a localização destas proteínas na mitocôndria (por microscopia confocal) e a morfologia mitocondrial (por microscopia eletrónica).

Os resultados apresentados são originais e representa, uma contribuição muito relevante no estudo do envolvimento do mtDNA na DFT.

## **7. Referências bibliográficas**

---



- Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky V, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov A, Sunyaev S. *Nature Methods*. 2010; 7: 248-249;
- Alva G, Potkin S. Alzheimer disease and other dementias. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2003;19: 763-776;
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *DSM-IV-TR: Manual de Diagnóstico e Estatística das Perturbações Mentais*. 4ª Edição. Lisboa. Climepsi Editores. 2002;
- Anderson S, Bankier A, Barrell B, de Bruijn M, Coulson A, Drouin J, Eperon I, Nierlich D, Roe B, Sanger F, Schreier P, Smith A, Staden R, Young I, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290: 457-465;
- Andrews R, Kubacka I, Chinnery P, Lightowlers R, Turnbull D, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*. 1999; 23: 147;
- Antuono P, Beyer J. The burden of dementia: a medical and research perspective. *Theoretical Medicine and Bioethics*. 1999; 20: 3-13;
- Arnold S, Kadenbach B. The intramitochondrial ATP/ADP ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Letters*. 1999; 443: 105-108;
- Ayala Y, Conti L, Avendano-Vasquez S, Dhir A, Romano M, d'Ambrogio A, Tollervey J, Ule J, Baralle M, Buratti E, Baralle F. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *The EMBO Journal*. 2011; 30: 277-288;
- Beal M. Mitochondria takes center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of Neurology*. 2005; 58: 495-505;
- Bej A, Mahbubani M, Atlas R. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 1991; 26: 301-334;
- Bellance N, Lestienne P, Rossignol R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 2009; 14: 4015-4034;
- Borroni B, Alberici A, Grassi M, Turla M, Zanetti O, Bianchetti A, Volta G, Rozzini R, Gilberti N, Ballelli G, Padovani A. Is frontotemporal lobar degeneration a rare disorder? Evidence from a preliminary study in Brescia Country, Italy. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010; 19: 11-16;
- Boxer A, Geschwind M, Belfor N, Gorno-Tempini M, Schauer G, Miller B, Weiner M, Rosen H. Patterns of brain atrophy that differentiate corticobasal degeneration syndrome from progressive supranuclear palsy. *Archives of Neurology*. 2006; 63: 81-86;
- Brandon M, Lott M, Nguyen K, Spolim S, Navathe S, Baldi P, Wallace D. MITOMAP: a human mitochondrial genome database — 2004 update. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33: D611- D613;
- Brunden K, Trojanowski J, Lee V. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009; 8: 783-793;
- Buitrago J, Jimenez J. *Patologia Molecular*. 1ª Edição. Aravaca. Mcgraw-Hill Interamericana de España S.A., 2001;
- Cairns N, Bigio I, Neumann M, Lee V, Hatanpaa K, White C, Schneider J, Grinberg L, Halliday G, Duyckaerts C, Lowe J, Holm I, Tolnay M, Okamoto K, Yokoo H, Murayama S, Woulfe J, Munoz D, Dickson D, Ince P, Martins C, 2012

- Trojanowski J, Mann D; Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathologica*. 2007; 114: 5-22;
- Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth S, Chang B, Goldberger O, Spinazzola A, Zeviani M, Carr S, Mootha V. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nature Genetics*. 2006; 38: 576-582;
- Camicioli R. Distinguishing Different Dementias. *Canadian Review of Alzheimer's Disease and Other Dementias*. 2006; 9: 4-11;
- Cash A, Aliev G, Siedlak S, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina A, Vinters H, Tabaton M, Johnson A, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones P, Castellani R, Smith M, Perry G. Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *The American Journal of Pathology*. 2003; 162: 1623-1627;
- Chang L, Cornford M, Miller B, Itabashi H, Mena I. Neuronal ultrastructural abnormalities in a patient with frontotemporal dementia and motor neuron disease. *Dementia*. 1995; 6: 1-8;
- Charlieu J. PCR as a technique used daily in molecular biology. PCR technology – current innovations. Florida. CRC Inc. 1994;
- Chevalier-Larsen E, Holzbaur E. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1762: 1094-1108;
- Cruts M, Gijselincx I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin J, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, De Pooter T, Mattheijssens M, Van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, De Deyn P, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 2006; 442: 920-924;
- Csordas G, Varnai P, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider T, Balla T, Hajnoczky G. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular Cell*. 2010; 39: 121-132;
- De la Monte S, Luong T, Neely T, Robinson D, Wands J. Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease. *Laboratory Investigation*. 2000; 80: 1323-1335;
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie I, Boeve B, Boxer A, Baker M, Rutherford N, Nicholson A, Finch N, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung G, Karydas A, Seeley W, Josephs K, Coppola G, Geschwind D, Wszolek Z, Feldman H, Knopman D, Petersen R, Miller B, Dickson D, Boylan K, Graff-Radford N, Rademakers R. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011; 72: 245-256;
- Diaz F. Cytochrome c oxidase deficiency: patients and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1802: 100-110;
- DiMauro S, Schon E. Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*. 2008; 31: 91-123;

- Elvira G, Wasiak S, Blandford V, Tong X, Serrano A, Fan X, Sanchez Carbente M, Servant F, Bell A, Boismenu D, Lacaille J, McPherson P, DesGroseillers L, Sossin W. Characterization of an RNA granule from developing brain. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006; 5: 635-651;
- Fichera M, Lo Giudice M, Falco M, Sturnio M, Amata A, Calabrese O, Bigoni S, Calzolari E, Neri M. Evidence of kinesin heavy chain (*KIF5A*) involvement in pure hereditary spastic paraplegia. *Neurology*. 2004; 63: 1108-1110;
- Filosto M, Scarpelli M, Cotelli M, Vielmi V, Todeschini A, Gregorelli V, Tonin P, Tomelleri G, Padovani A. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology*. 2011; 258: 1763-1764;
- Freibaum B, Chitta R, High A, Taylor J. Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *Journal of Proteome Research*. 2010; 9: 1104-1120;
- Gans A. Betrachtungen über Art und Ausbreitung des krankhaften Prozesses in einem Fall von Pickscher Atrophie des Sternhirns. *Gesamte Neurologie und Psychiatrie*. 1922; 80: 10-28;
- Geldmacher D. Differential diagnosis of dementia syndromes. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2004; 20: 27-43;
- Giorgi C, Romagnoli A, Pinton P, Rizzuto R.  $Ca^{2+}$  signaling, mitochondria and cell death. *Curr Molecular Medicine*. 2008; 8: 119-130;
- Gislason T, Sjogren M, Larsson L, Skoog I. The prevalence of frontal variant frontotemporal dementia and the frontal lobe syndrome in a population based sample of 85 year olds. *The Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2003; 74: 867-871;
- Goedert M, Jakes R, Crowther R. Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Letters*. 1999; 450: 306-311;
- Goedert M, Jakes R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimical et Biophysical Acta*. 2005; 1739, 240-250;
- Goedert M, Spillantini M. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 2006; 314: 777-781;
- Goedert M, Ghetti B, Maria Grazia Spillantini. Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012; 2: a006254;
- Gorno-Tempini M, Dronkers N, Rankin K, Ogar J, Phengrasamy L, Rosen H, Weiner M, Miller B. Cognition and anatomy in three variants of primary progressive afasia. *Annals of Neurology*. 2004A; 55: 335-346;
- Gorno-Tempini M, Murray R, Rankin K, Weiner M, Miller B. Clinical, cognitive and anatomical evolution from nonfluent progressive aphasia to corticobasal syndrome: a case report. *Neurocase*. 2004B; 10: 426-436;
- Gray M. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology*. 1989; 5: 25-50;
- Grazina M. Genoma mitocondrial e défice energético no diagnóstico das doenças da cadeia respiratória mitocondrial. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2004;
- Grazina M, Silva F, Santana I, Santiago B, Mendes C, Simões M, Oliveira M, Cunha L, Oliveira C. Frontotemporal dementia and mitochondrial DNA transitions. *Neurobiology of disease*. 2004; 15: 306-311;

- Grazina M, Pratas J, Silva F, Oliveira S, Santana I, Oliveira C. Genetic basis of Alzheimer's dementia: role of mtDNA mutations. *Genes, Brain and Behaviour*. 2006; 5: 92-107;
- Grossman M, Mickanin J, Onishi K, Hughes E, D'Esposito M, Ding X, Alavi A, Reivich M. Progressive nonfluent aphasia: Language, cognitive, and PET measures contrasted with probable Alzheimer disease. *Journal of Cognitive Neuroscience*. 1996; 8: 135-154;
- Guimarães J, Fonseca R, Garret C. DEMÊNCIA FRONTOTEMPORAL Que identidade? *Acta Médica Portuguesa*. 2006; 19: 319-324;
- Hamblet N, Ragland B, Ali M, Conyers B, Castora F. Mutations in mitochondrial-encoded cytochrome c oxidase subunits I, II and III genes detected in Alzheimer's disease using single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis*. 2006; 27: 398-408;
- Harvey R, Skelton-Robinson M, Rossor M. The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *The Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2003; 74: 1206-1209;
- Hasegawa M, Smith M, Goedert M. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Letters*. 1998; 437: 207-210;
- He Z, Bateman A. Pro-granulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *Journal of Molecular Medicine*. 2003; 81: 600-612;
- Helling S, Vogt S, Rhiel A, Ramzan R, Wen L, Marcus K, Kadenbach B. Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008; 7: 1714-1724;
- Hodges J, Davies R, Xuereb J. Survival in frontotemporal dementia. *Neurology*. 2003; 61: 349-354;
- Hodges J, Patterson K. Semantic dementia: a unique clinicopathological syndrome. *Lancet Neurology*. 2007; 6: 1004-1014;
- Holm I, Isaacs A, Mackenzie I. Absence of FUS-immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene. *Acta Neuropathologica*. 2009; 118: 719-720;
- Hutton M, Lendon C, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen R, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon J, Nowotny P, Che L, Norton J, Morris J, Reed L, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd P, Hayward N, Kwok J, Schofield P, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra B, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998; 393, 702-705;
- Igaz L, Kwong L, Xu Y, Truax A, Uryu K, Neumann M, Clark C, Elman L, Miller B, Grossman M, McCluskey L, Trojanowski J, Lee V. Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *The American Journal of Pathology*. 2008; 173: 182-94;
- Instituto Nacional de Estatística. Anuário estatístico de Portugal 2010 (Ano de edição 2011). Lisboa. 2012;
- Jiang Y, Ellis T, Greenlee A. Genotyping Parkinson disease-associated mitochondrial polymorphisms. *Clinical Medicine & Research*. 2004; 2: 99-106;

- Johnson J, Diehl J, Mendez M, Neuhaus J, Shapira J, Forman M, Chute D, Roberson E, Pace-Savitsky C, Neumann M, Chow T, Rosen H, Forstl H, Kurz A, Miller B. Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Archives of Neurology*. 2005; 62: 925-930;
- Josephs K, Holton J, Rossor M, Godbolt A, Ozawa T, Strand K, Khan N, Al-Sarraj S, Revesz T. Frontotemporal lobar degeneration and ubiquitin immunohistochemistry. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2004; 30: 369-373;
- Josephs K, Stroh A, Dugger B, Dickson D. Evaluation of subcortical pathology and clinical correlations in FTL-D subtypes. *Acta Neuropathologica*. 2009; 118: 349-358;
- Josephs K, Whitwell J, Parisi J, Petersen R, Boeve B, Jack C, Dickson D. Caudate atrophy on MRI is a characteristic feature of FTL-D-FUS. *European Journal of Neurology*. 2010; 17: 969-975;
- Josephs K, Hodges J, Snowden J, Mackenzie I, Neumann M, Mann D, Dickson D. Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathologica*. 2011; 122: 137-153;
- Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1604: 77-94;
- Kester M, Scheltens P. Dementia: the bare essentials. *Practical Neurology*. 2009; 9: 241-251;
- King S, Stocco D. ATP and a mitochondrial electrochemical gradient are required for functional activity of the steroidogenic acute regulatory protein in isolated mitochondria. *Endocrine Research*. 1996; 22: 505-514;
- Knopman D, Petersen R, Edland S, Cha R, Rocca W. The incidence of frontotemporal lobar degeneration in Rochester, Minnesota, 1990 through 1994. *Neurology*. 2004; 62: 506-508;
- Kovacs G, Murrell J, Horvath S, Haraszti L, Majtenyi K, Molnar M, Budka H, Ghetti B, Spina S. TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea. *Movement Disorders*. 2009; 24: 1843-1847;
- Landsverk M, Cornwell M, Palculiet M. Sequencing analysis of the whole mitochondrial genome and nuclear genes causing mitochondrial disorders. *Em Wong L. Mitochondrial disorders: Biochemical and molecular analysis, methods in molecular biology*. London. Humana Press. 2012;
- Lapointe N, Morfini G, Pigino G, Gaisina I, Kozikowski A, Binder L, Brady S. The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: Implications for filament toxicity. *Journal of Neuroscience Research*. 2009; 87: 440-451;
- Lee G, Neve R, Kosik K. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*. 1989; 2: 1615-1624;
- Lin F, Lin R, Wisniewski H, Hwang W, Grundke-Iqbal I, Healy-Louie G, Iqbal K. Detection of point mutations in codon 331 of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 in Alzheimer's brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1992; 182: 238-246;
- Lin M, Simon D, Ahn C, Kim L, Beal M. High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Human Molecular Genetics*. 2002; 11: 133-145;
- Lin W, Lewis J, Yen S, Hutton M, Dickson D. Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau. *Journal of Neurocytology*. 2003; 32: 1091-1105;

- Ling S, Albuquerque C, Han J, Lagier-Tourenne C, Tokunaga S, Zhou H, Cleveland D. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote complexes with FUS/TLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 13318-13323;
- Lipton A, White C, Bigio E. Frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease-type inclusions predominates in 76 cases of frontotemporal degeneration. *Acta Neuropathologica*. 2004; 108: 379-385;
- Lister R, Hulett J, Lithgow T, Whelan J. Protein import into mitochondria: origins and functions today. *Molecular Membrane Biology*. 2005; 22: 87-100;
- Litvan I, Agid Y, Calne D, Campbell G, Dubois B, Duvoisin R, Goetz C, Golbe L, Grafman J, Growdon J, Hallett M, Jankovic J, Quinn N, Tolosa E, Zee D. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome). *Neurology*. 1996; 47: 1-9;
- Lobo A, Launer L, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler M, Copeland J, Dartigues J, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group *Neurology*. 2000; 54 (11 Suppl 5): S4-S9;
- Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology*. 2002; 59: 1077-1079;
- Lomen-Hoerth C. Characterization of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2004; 17: 337-341;
- Lu M, Kosik K. Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Molecular Biology of the Cell*. 2001; 12: 171-184;
- Lyketsos C, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick A, Breitner J, DeKosky S. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *The Journal of the American Medical Association*. 2002; 288: 1475-1483;
- Mackenzie I, Baborie A, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Jaros E, Perry R, Neary D, Snowden J, Mann D. Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype. *Acta Neuropathologica*. 2006; 112: 539-549;
- Mackenzie I, Neumann M, Bigio E, Cairns N, Alafuzoff I, Kril J. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathologica*. 2009; 117: 15-18;
- Mackenzie I, Neumann M, Bigio N, Cairns N, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs G, Ghetti B, Halliday G, Holm I, Ince P, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller A, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson D, Trojanowski J, Mann D. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathologica*. 2010; 119: 1-4;
- Manning C. Beyond memory: neuropsychologic features in differential diagnosis of dementia. *Clinics in Geriatric Medicine*. 2004; 20: 45-58;

- Margineantu D, Cox W, Sundell L, Sherwood S, Beechem J, Capaldi R. Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion*. 2002; 1: 425-435;
- Margulis L. Symbiosis in cell evolution. San Francisco. Freeman W H & Co. 1981;
- Mattson M, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*. 2008; 60: 748-766;
- McFarland R, Turnbull D. Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *Journal of Internal Medicine*. 2009; 265: 210-228;
- McKhann G, Albert M, Grossman M, Miller B, Dickson D, Trojanowski J. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia. *Archives of Neurology*. 2001; 58: 1803-1809;
- McPherson M, Moller S. PCR. 2ª Edição. Taylor & Francis Group. Abingdon. 2006;
- Mercy L, Hodges J, Dawson K, Barker R, Brayne C. Incidence of early-onset dementias in Cambridgeshire, United Kingdom. *Neurology*. 2008; 71: 1496-1499;
- Mirakhor A, Craig D, Hart D, McLroy S, Passmore A. Behavioural and psychological syndromes in Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2004; 19: 1035-1039;
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2011;
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*. 1986; 51: 263-273;
- Mummery C, Patterson K, Wise R, Vandenberg R, Price C, Hodges J. Disrupted temporal lobe connections in semantic dementia. *Brain*. 1999; 122: 61-73;
- Murphy M, Holmgren A, Larsson N, Halliwell B, Chang C, Kalyanaraman B, Rhee S, Thornalley P, Partridge L, Gems D, Nystrom T, Belousov V, Schumacker P, Winterbourn C. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metabolism*. 2011; 13: 361-366;
- Neary D, Snowden J, Northen B, Goulding P. Dementia of frontal lobe type. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1988; 51: 353-361;
- Nestor P, Graham N, Fryer T, Williams G, Patterson K, Hodges J. Progressive non-fluent aphasia is associated with hypometabolism centred on the left anterior insula. *Brain*. 2003; 126: 2406-2418;
- Neumann M, Sampathu D, Kwong L, Truax A, Micsenyi M, Chou T, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark C, McCluskey L, Miller B, Masliah E, Mackenzie I, Feldman H, Feiden W, Kretschmar H, Trojanowski J, Lee V. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006; 314: 130-133;
- Neve R, Harris P, Kosik K, Kurnit D, Donlon T. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Research*. 1986; 387: 271-280;
- Ng P, Henikoff S. Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006; 7: 61-80;
- Nguyen P, Marin L, Atwood H. Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *Journal of Neurophysiology*. 1997; 78: 281-294;
- Martins C, 2012

- Nunes B, Silva R, Cruz V, Roriz J, Pais J, Silva M. Prevalence and pattern of cognitive impairment in rural and urban populations from Northern Portugal. *BMC Neurology*. 2010; 11: 10-42;
- Numomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith M, Perry G. Oxidative Damage to RNA in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2006; 2006: 1-6;
- Onari K, Spatz H. Anatomische Beitrage zur Lehre von Pickschen umschriebenen Grosshirnrinden-Atrophie ("Pickschen Krankheit"), *Gesamte Neurologie und Psychiatrie*. 1926; 101: 470-511;
- Pello C, Marti M, Carelli V, Nijtmans L, Achilli A, Pala M, Torroni A, Gomez-Duran A, Ruiz-Pesini E, Martinuzzi A, Smeitink J, Arenas J, Ugalde C. Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Human Molecular Genetics*. 2008; 17: 4001-4011;
- Petros A, Baumann A, Ruiz-Pesini E, Amin M, Sun C, Hall J, Lim S, Issa M, Flanders W, Hosseini S, Marshall F, Wallace D. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *PNAS*. 2004; 102: 719-724;
- Pick A. Ueber die der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager Medizinische Wochenschrift*. 1892; 16: 165-167;
- Pick A. Ueber einen weiteren Symptomenkomplex im Rahmen der Dementia senilis, bedingt durch umschriebene, starkene Hirnatrophie (germischte Apraxie) sur Aphasie. *Monatschrift fur Psychiatrie und Neurologie*. 1906; 19: 97-108;
- Piguet O, Piguet O, Hornberger M, Mioshi E, Hodges J. Behavioural variant frontotemporal dementia: diagnosis, clinical staging, and management. *Lancet Neurology*. 2011; 10:162-172;
- Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt K, Huelga S, Moran J, Liang T, Ling S, Sun E, Wanczewicz E, Mazur C, Kordasiewicz H, Sedaghat Y, Donohue J, Shiue L, Bennett C, Yeo G, Cleveland D. Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nature Neuroscience*. 2011; 14: 459-468;
- Pulkes T, Hanna M. Human mitochondrial DNA diseases. *Advanced Drug Delivery*. 2001; 49: 27-43;
- Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2009; 11: 111-128;
- Rabinovici G, Miller B. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 2010; 24: 375-398;
- Rademakers R, Cruts M, van Broeckhoven C. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Human Mutation*. 2004; 24: 277-295;
- Ramsden, Jeremy J. *Bioinformatics: An Introduction*. New York. Springer. 2009;
- Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges J. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2002; 58: 1615-1621;
- Renton A, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs J, Schymick J, Laaksovirta H, Van Swieten J, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes A, Kaganovich A, Scholz S, Duckworth J, Ding J, Harmer D, Hernandez D, Johnson J, Mok K, Ryten M, Trabzuni D, Guerreiro R, Orrell R, Neal J, Murray A, Pearson, J, Jansen I, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister J, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls M, Peuralinna T, Martins C, 2012



- Jansson L, Isoviita V, Kaivorinne A, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M, ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein J, Sendner M, Drepper C, Eichler E, Alkan C, Abdullaev Z, Pack S, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams N, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris H, Tienari P, Traynor B. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*; 2011; 72: 257-268;
- Roberson E, Hesse J, Rose K, Slama H, Johnson J, Yaffe K, Forman M, Miller C, Trojanowski J, Kramer J, Miller B. Frontotemporal dementia progresses to death faster than Alzheimer disease. *Neurology*. 2005; 65: 719-25;
- Rohrer J, Geser F, Zhou J, Gennatas E, Sidhu M, Trojanowski J, Dearmond S, Miller B, Seeley W. TDP-43 subtypes are associated with distinct atrophy patterns in frontotemporal dementia. *Neurology*. 2010; 75: 2204-2211;
- Rohrer J. Structural Brain imaging in frontotemporal dementia. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;
- Rosso S, Donker Kaat L, Baks T, Joosse M, de Koning I, Pijnenburg Y, de Jong D, Dooijes D, Kamphorst W, Ravid R, Niermeijer M, Verheij F, Kremer H, Scheltens P, van Duijn C, Heutink P, van Swieten J. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain*. 2003; 126: 2016-2022;
- Rugarli E, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *The EMBO Journal*. 2012; 31: 1336-1349;
- Saiki K. Amplification of genomic DNA. PCR protocols – a guide to methods and applications. *California Academic Press*. 1990;
- Santana I, Cunha L. Demências - Manual para Médicos, Amadora, 2005;
- Seelaar H, Kamphorst W, Rosso S, Azmani A, Masdjedi R, de Koning I, Maat-Kievit J, Anar B, Donker Kaat L, Breedveld G, Dooijes D, Rozemuller J, Bronner I, Rizzu P, van Swieten J. Distinct genetic forms of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2008; 71: 1220-1226;
- Seelaar H, Klijnsma K, de Koning I, van der Lugt A, Chiu W, Azmani A, Rozemuller A, van Swieten J. Frequency of ubiquitin and FUS-positive, TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Journal of Neurology*. 2010; 257: 747-753;
- Seelaar H, Rohrer J, Pijnenburg Y, Fox N, van Swieten J. Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2011; 82: 476-486;
- Seeley W, Crawford R, Rascofsky K, Weiner M, Miller B, Gorno-Tempini M. Frontal paralimbic network atrophy in very mild behavioral variant frontotemporal dementia. *Archives of Neurology*. 2008; 65: 249-255;
- Seeley W, Crawford R, Zhou J, Miller B, Greicius M. Neurodegenerative diseases target large-scale human brain networks. *Neuron*. 2009; 62: 42-52;
- Schneider C. Über Picksche Krankheit. *Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie*. 1927; 65: 230-275;

- Schroeter M, Raczka K, Neumann J, von Cramon D. Neural networks in frontotemporal dementia – a meta analysis. *Neurobiology of Aging*. 2008; 29: 418-426;
- Shaw C. Capturing VCP: Another molecular piece in the ALS jigsaw puzzle. *Neuron*. 2010; 68: 812-814;
- Shoffner J, Brown M, Torroni A, Lott M, Cabell M, Mirra S, Beal M, Yang C, Gearing M, Salvo R, Watts R, Juncos J, Hansen L, Crain B, Fayad M, Reckord C, Wallace D. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer Disease and Parkinson Disease patients. *Genomics*. 1993; 17: 171-184;
- Sjogren M, Andersen C. Frontotemporal dementia – a review. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2006; 127: 180-187;
- Sjogren M, Wallin A. Pathophysiological aspects of frontotemporal dementia – emphasis on cytoskeleton proteins and autoimmunity. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001; 122: 1923-1935;
- Skibinski G, Parkinson N, Brown J, Charkrabarti L, Lloyd S, Hummerich H, Nielsen J, Hodges J, Spillantini M, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor M, Gade A, Johannsen P, Sorensen S, Gydesen S, Fisher E, Collinge J. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nature Genetics*. 2005; 37: 806-808;
- Smeitink J, Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Genetics Reviews*. 2001; 2: 342-352;
- Spillantini M, Murrell J, Goedert M, Farlow M, Klug A, Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95: 7737-7741;
- Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene*. 2005; 354: 162-168;
- Spinazzola A, Zeviani M. Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *Journal of Internal Medicine*. 2009; 265: 174-192;
- Steinberg M, Corcoran C, Tschanz J, Huber C, Welsh-Bohmer K, Norton M, Zandi P, Breitner J, Steffens D, Lyketsos C. Risk factors for neuropsychiatric symptoms in dementia: the Cache County Study. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2006; 21: 824-830;
- Stellwagen N. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *National Institutes of Health Public Access*. 2009; 30: 188-195;
- Sun Z, Diaz Z, Fang X, Hart P, Chesi A, Shorter J, Gitler A. Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and Toxicity for the ALS Disease Protein FUS/TLS. *PLoS Biology*. 2011; 9: e1000614;
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Development: ubiquitina tag for sperm mitochondria. *Nature*. 1999; 402: 371-372;
- Taylor R, Turnbull D. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2007; 6: 389-402;
- The Lund and Manchester Groups. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1994; 57: 416-18;

- Ticozzi N, Silani V, LeClerc A, Keagle P, Gellera C, Ratti A, Taroni F, Kwiatkowski T, McKenna-Yasek D, Sapp P, Brown R, Landers J. Analysis of FUS gene mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis within an Italian cohort. *Neurology*. 2009; 73: 1180-1185;
- Tollervey J, Curk T, Rogelj B, Riese M, Cereda M, Kayikci M, Konig J, Hortobagyi T, Nishimura A, Zupunski V, Patani R, Chandran S, Rot G, Zupan B, Shaw C, Ule J. Characterizing the RNA targets and positiondependent splicing regulation by TDP-43. *Nature Neuroscience*. 2011; 14: 452-458;
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawaltoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*. 1996; 272: 1136-1144;
- Turnbull H, Lax N, Diodato D, Ansorge O, Turnbull D. The mitochondrial brain: from mitochondrial genome to neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1802: 111-121;
- Urwin H, Josephs K, Rohrer J, Mackenzie I, Neumann M, Authier A, Seelaar H, Van Swieten J, Brown J, Johannsen P, Nielsen J, Holm I, FReJA Consortium, Dickson D, Rademakers R, Graff-Radford NR, Parisi JE, Petersen RC, Hatanpaa K, White C, Weiner M, Geser F, Van Deerlin V, Trojanowski J, Miller B, Seeley W, van der Zee J, Kumar-Singh S, Engelborghs S, De Deyn P, Van Broeckhoven C, Bigio E, Deng H, Halliday G, Kril J, Munoz D, Mann D, Pickering-Brown S, Doodeman V, Adamson G, Ghazi-Noori S, Fisher E, Holton J, Revesz T, Rossor M, Collinge J, Mead S, Isaacs A. FUS pathology defines the majority of tau- and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathologica*. 2010; 120: 33-41;
- Van der Walt J, Dementieva Y, Martin E, Scott W, Nicodemus K, Kroner C, Welsh-Bohmer K, Saunders A, Roses A, Small G, Schmechel D, Doraiswamy P, Gilbert J, Haines J, Vance J, Periak-Vance M. *Neuroscience Letters*. 2004; 365: 28-32;
- Van Swieten J, Heutink P. Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*. 2008; 7: 965-974;
- Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith B, Hu X, Sreedharan J, Siddique T, Schelhaas H, Kusters B, Troost D, Baas F, de Jong V, Shaw C. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.p2–21.3. *Brain*. 2006; 129: 868-876;
- Videira A. Engenharia Genética, Princípios e Aplicações. Lisboa. Lidel. 2001;
- Villa C, Ghezzi L, Pietroboni A, Fenoglio C, Cortini F, Serpente M, Cantoni C, Ridolfi E, Marcone A, Benussi L, Ghidoni R, Jacini F, Arighi A, Fumagalli G, Mandelli A, Binetti G, Cappa S, Bresolin N, Scarpini E, Galimberti D. A novel MAPT mutation associated with the clinical phenotype of progressive non-fluent aphasia. *Journal of Alzheimers Disease*. 2011; 26: 19-26;
- Wallace D, Brown M, Lott M. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999; 238: 211-230;
- Wallace D. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics*. 2005; 39: 359-407;

- Wallace D, Lott M, Procaccio V. Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging. Capítulo 1. Volume 1. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 5ª Edição (Rimoin D, Connor J, Pyeritz R, Korf B). Philadelphia. Churchill Livingstone Elsevier. 2007;
- Wallace D, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annual Reviews of Pathology-Mechanisms of Disease*. 2010; 5: 297-348;
- Wang I, Wu L, Chang H, Shen C. TDP-43, the signature protein of FTL-D, is a neuronal activity-responsive factor. *Journal of Neurochemistry*. 2008; 105: 797-806;
- Watts G, Wymer J, Kovach M, Mehta S, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte M, Kimonis V. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature Genetics*. 2004; 36: 377-381;
- Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M & Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*. 1994; 22: 4354-4355.
- Westermeier R. Electrophoresis in Practice. Alemanha. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA. 2005;
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *ICD-10 – International Statistical Classification of Diseases and Related Problems*. 10th Revision. Geneva: World Health Organization, 1992;
- White A. Mitochondrial toxicity and HIV therapy. *Sexually Transmitted Infections*. 2001; 77: 158-173;
- Whitwell J, Jack C, Senjem M, Josephs K. Patterns of atrophy in pathologically confirmed FTL-D with and without motor neuron degeneration. *Neurology*. 2006; 66, 102-104;
- Whitwell J, Avula R, Senjem M, Kantarci K, Weigand S, Samikoglu A, Edmonson H, Vemuri P, Knopman D, Boeve B, Petersen R, Josephs K, Jack C. Gray and white matter water diffusion in the syndromic variants of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2010A; 74: 1279-1287;
- Whitwell J, Jack C, Parisi J, Senjem M, Knopman D, Boeve B, Rademakers R, Baker M, Petersen R, Dickson D, Josephs K. Does TDP-43 type confer a distinct pattern of atrophy in frontotemporal lobar degeneration? *Neurology*. 2010B; 75: 2212-2220;
- Whitwell J, Josephs K. Neuroimaging in frontotemporal lobar degeneration – predicting molecular pathology. *Nature Reviews Neurology*. 2012; 8: 131-142;
- Wilson K, Prochaska L. Phospholipid vesicles containing bovine heart mitochondrial cytochrome c oxidase and subunit III-deficient enzyme: analysis of respiratory control and proton translocating activities, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1990; 282: 413-420;
- Wong L, Boles R. Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*. 2005; 354: 1-20;
- Yu C, Bird T, Bekris L, Montine T, Leverenz J, Steinbart E, Galloway N, Feldman H, Woltjer R, Miller C, Trojanowski J, Lee V, Schellenberg G, Van Deerlin V. The spectrum of mutations in progranulin. *Archives of Neurology*. 2010; 67: 161-170;