

Investigação molecular em 20 doentes com citopatia mitocondrial

Célia Nogueira¹, Manuel Santos², Laura Vilarinho¹

RESUMO

Nos últimos 30 anos, um largo espectro de doenças multissistémicas associadas a disfunções da mitocôndria, designando-se globalmente de citopatias mitocondriais, têm sido referenciadas, com sintomatologia desde o período neonatal até à idade adulta. Estas disfunções podem afectar qualquer órgão ou tecido do organismo, embora os músculos esquelético e cardíaco, e o SNC sejam os mais afectados, devido à sua elevada dependência do metabolismo energético. Há mais de uma década que a investigação molecular em patologias humanas relacionadas com disfunções da mitocôndria, tem sido centralizada no DNA mitocondrial (mtDNA) embora nos últimos anos, o foco da atenção se tenha voltado para a pesquisa de mutações no DNA nuclear (nDNA).

Objectivos: O principal objectivo deste estudo foi investigar ao nível molecular (mtDNA e nDNA), indivíduos clínicos, histológica e/ou bioquimicamente reconhecidos com patologia mitocondrial.

Pacientes e Métodos: Foram estudados 20 doentes provenientes de hospitais de todo o país com alterações sugestivas de citopatia mitocondrial. Foram pesquisadas: i) alterações mais frequentes do mtDNA descritas na literatura, nomeadamente mutações pontuais e deleções. ii) novas mutações nos genes codificantes dos tRNAs mitocondriais e genes estruturais do mtDNA codificantes de subunidades da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). iii) mutações nos genes nucleares que codificam subuni-

dades da CRM ou estejam envolvidos no *assembly* das mesmas.

Resultados: Dez dos 20 doentes investigados apresentaram mutações pontuais patogénicas já descritas na literatura e deleções ao nível do mtDNA. Em quatro pacientes foram encontradas cinco novas mutações nos genes dos tRNAs. Três pacientes apresentaram um possível défice da ubiquinona. Em dois pacientes com síndrome de Leigh, foram encontrados duas novas mutações no gene de *assembly* (SURF1) da Citocromo c oxidase (COX), e por último no paciente com défice do complexo III da CRM, estão a ser efectuados estudos de *linkage* ao nível do cromossoma X.

Conclusões: Neste estudo partiu-se de vários fenótipos clínicos e bioquímicos, sugestivos de patologia mitocondrial, para a caracterização dos genótipos associados, de modo a estabelecer um diagnóstico preciso destas patologias. A caracterização molecular dos 20 doentes com citopatia mitocondrial propostos para este estudo foi realizada com êxito em 14/20 (70%) dos pacientes.

Palavras-Chave: Cadeia respiratória mitocondrial, OXPHOS, tRNAs, mtDNA, nDNA.

Nascer e Crescer 2005; 14(4): 277-285

INTRODUÇÃO

A mitocôndria tem um papel fundamental na produção de energia e uma alteração do metabolismo mitocondrial pode conseqüentemente originar uma doença. A natureza ubiquitária da mitocôndria, os dois tipos de controlo genético (mitocondrial e nuclear) da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) e os conceitos característicos da genética mitocondrial,

são os factores que contribuem para um largo espectro de manifestações clínicas associados a disfunções numa área restrita mas vital do metabolismo mitocondrial: a fosforilação oxidativa (OXPHOS), que representa a etapa final do metabolismo oxidativo, onde a maior parte do ATP celular é gerado⁽¹⁾.

Os défices da OXPHOS podem afectar qualquer órgão ou tecido do organismo, sendo os músculos esquelético e cardíaco e o SNC os mais afectados, devido à sua elevada dependência do metabolismo energético. Assim se compreende que as formas de apresentação mais frequentes incluem: o quadro miopático, a encefalo(mio)patia e a oftalmoplegia externa progressiva (PEO)⁽²⁾. É a associação de sintomas e sinais neurológicos, não explicáveis em termos de topografia de lesões ou de atingimento preferencial de sistemas específicos, que pode evocar este diagnóstico, não existindo, um quadro clínico específico de Citopatia Mitocondrial.

Um recente estudo epidemiológico demonstrou que aproximadamente 1 em 10.000 indivíduos na população adulta e infantil possuem doenças mitocondriais ou correm o risco de as virem a desenvolver, o que indica que estas doenças constituem o maior grupo de erros inatos do metabolismo. Estes resultados reflectem que estas doenças são uma causa comum de morbilidade crónica, não estando disponível, até ao momento, nenhuma terapia eficaz⁽³⁾.

Wallace e colaboradores (1988), descreveram pela primeira vez uma mutação no DNA mitocondrial (mtDNA) como causa de doença, abrindo um novo capítulo na Medicina, a Medicina Mitocondrial. Desde então, cerca de uma centena de mutações pontuais patogéni-

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

² Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

cas diferentes e de deleções foram identificadas⁽⁴⁾.

Estas mutações podem ser agrupadas em quatro grandes grupos: i) rearranjos de grandes dimensões (deleções e duplicações); ii) mutações pontuais nos genes mitocondriais codificantes de proteínas; iii) mutações pontuais nos genes dos rRNAs; iv) mutações pontuais nos genes dos tRNAs⁽⁵⁾.

Nos últimos anos, o foco da atenção voltou-se para a pesquisa de mutações no DNA nuclear (nDNA), em genes que codificam subunidades estruturais da CRM / OXPHOS, genes necessários ao *assembly* das mesmas, ou envolvidos na comunicação intergenómica⁽⁶⁾.

Os genomas nuclear e mitocondrial estão separados, mas funcionam em coordenação aparentemente sob o controlo do genoma nuclear. A replicação, transcrição e tradução do genoma mitocondrial dependem de factores codificados pelo nDNA.

Algumas doenças têm sido associadas a defeitos na comunicação intergenómica, e podem ser caracterizadas quer pela presença de deleções múltiplas do mtDNA, como é o caso da PEO de transmissão autossómica dominante e recessiva e da encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE), quer por depleção ao nível da molécula de mtDNA, que está presente nos casos de depleção infantil fatal de mtDNA⁽⁷⁾.

Nos últimos cinco anos, foram encontradas várias mutações nos genes nucleares que codificam inúmeras proteínas envolvidas na biogénese mitocondrial e na OXPHOS. Cada vez mais, as mutações no nDNA estão a ser apontadas como causa de encefalomiopatias mitocondriais, contribuindo, assim, para a abertura de uma nova era “nuclear” na genética mitocondrial humana⁽⁸⁾.

É de realçar que apenas uma diminuta percentagem das necessidades proteicas mitocondriais é satisfeita pela própria mitocôndria. Noventa e cinco por cento das proteínas mitocondriais são codificadas por genes nucleares, produzidas como percursores nos polissomas citoplasmáticos, importadas para a mitocôndria e aí processadas e agrupadas nos compartimentos mitocondriais adequados.

Devido ao complexo controlo genético da mitocôndria, as proteínas codificadas pelos dois genomas têm que coexistir estequiometricamente de modo a formarem cinco complexos funcionais. Assim, as alterações ao nível das subunidades codificadas pelos dois genomas, quer o incorrecto enrolamento e/ou *assembly* dessas subunidades provocado por mutações nos genes envolvidos, podem causar doenças da OXPHOS⁽⁹⁾.

MATERIAL E MÉTODOS

Os pacientes incluídos neste estudo eram provenientes de hospitais de todo o país e seleccionados com base: i) no fenótipo clínico apresentado. ii) no défice isolado ou combinado dos complexos da CRM detectados no estudo bioquímico da biópsia muscular. iii) na observação de RRFs (*ragged-red fibers*) ou de outras alterações sugestivas de citopatia mitocondrial detectadas no exame miopatológico.

Quadro I - Dados clínicos, morfológicos e bioquímicos dos 20 pacientes deste estudo.

| Paciente | Idade de diagnóstico (anos) | Fenótipo clínico | Histologia* | Actividade enzimática residual dos complexos da CRM* |
|----------|-----------------------------|---|-----------------------------|--|
| 1 | 5 | Distrofia escapulo humeral; cifoescoliose; parésia facial; tetraparésia; falta de forças | Fibras atrofiadas; COX(-) + | IV (26%) |
| 2 | 44 | Ptose palpebral; Atrofia dos músculos proximais dos membros superiores | RRFs + COX(-) ++ | IV (20%) |
| 3 | 56 | D. mitocondrial | RRFs +++ | Normal |
| 4 | 45 | Hx familiar de atingimento neurologico | Normal | III (35%) |
| 5 | 27 | D. mitocondrial; AVCs | Sobrecarga lipídica | IV(19%) |
| 6 | 57 | Miopatia metabólica; Défice da CPT (secundário) | Sobrecarga lipídica | I(21%); II(19%); IV(27%) |
| 7 | 5 | Miopatia | RRFs + | Normal |
| 8 | 65 | KSS | -- | Normal |
| 9 | 29 | Encefalopatia mioclónica progressiva; atraso mental; surdez | Sobrecarga lipídica | Normal |
| 10 | 22 | Hx epilepsia mioclónica e diabetes; AVC isquémico; baixa estatura; hipertricosose; polineuropatia periférica; hiperlactacidemia | RRFs + | Normal |
| 11 | 33 | Tetraparésia flácida com atrofia muscular; MERRF | RRFs +++ | IV (35%) |
| 12 | 43 | Atrofia óptica; LHON (?) | -- | -- |
| 13 | 66 | PEO | -- | I(32%); III(39%); IV(25%) |
| 14 | 35 | Perda bilateral da visão s/ causa aparente; LHON (?) | -- | -- |
| 15 | 39 | MERRF; Hx familiar | RRFs +++ | Normal |
| 16 | 65 | Miopatia mitocondrial | RRFs ++ | Normal |
| 17 | 25 | LHON | -- | -- |
| 18 | 17 | MNGIE; Polineuropatia axonal | -- | Normal |
| 19 | 2 | Síndrome de Leigh | -- | -- |
| 20 | 7 | Síndrome de Leigh | -- | -- |

Abreviaturas: (*) biópsia de músculo; (+) pouco frequente; (++) frequente; (+++) abundante; RRFs (red ragged fibers); COX (-) (fibras citocromo c oxidase negativas); (--) não determinado; MNGIE (encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial); KSS (Síndrome de Kearns-Sayre); ADPM (atraso do desenvolvimento psicomotor); AVC (acidente vascular cerebral); CPT (carnitina palmitoil- transferase); MERRF (epilepsia mioclónica com fibras rotas e vermelhas); LHON (neuropatia óptica hereditária de Leber).

gico da biópsia muscular, nomeadamente, fibras COX negativas (-) ou inclusões paracristalinas (Quadro I).

A investigação molecular do mtDNA e do nDNA foi efectuada em DNAs dos 20 doentes previamente seleccionados, através das técnicas de: 1) *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP)*; 2) sequenciação directa dos produtos da PCR; 3) análise de fragmentos; e 4) *Southern-blot*, para a detecção de rearranjos (delecções, duplicações) e quantificação do mtDNA presente num determinado tecido.

A extracção de DNA foi feita a partir de sangue total, *buffy coat* ou leucócitos, utilizando um kit comercial da *Qiagen*[®], e da fracção insolúvel dos homogeneizados das biópsias musculares obtida após centrifugação, pelo método do fenol/clo-rofórmio e precipitação com isopropanol.

1. Todos os estudos de análise directa do DNA efectuaram-se em produtos de PCR. Os fragmentos amplificados foram digeridos pela respectiva enzima de restrição durante 2h a 37°C e submetidos a electroforese horizontal em géis de poli-acrilamida (T=12%, C=3%). O sistema utilizado foi o *Multiphor (Pharmacia)* aco-plado a um sistema de refrigeração. Após a separação electroforética, as bandas

correspondentes aos fragmentos de DNA foram visualizadas por coloração com nitrato de prata. As mutações pesquisadas por rotina estão referidas no Quadro II. Esta metodologia também foi utilizada na análise filogenética de novas mutações ao nível do mtDNA, para determinar o grau de conservação dos nucleótidos envolvidos de modo a estabelecer a possível patogenicidade.

Nos casos positivos procedeu-se à marcação radioactiva dos amplificados com ³²P através da adição de 10µCi de [^α³²P]-dATP e execução de apenas dois ciclos adicionais no termociclador para evitar a formação de heteroduplexes. Os produtos de amplificação foram digeridos com a enzima de restrição adequada à mutação a quantificar e migraram em gel vertical de poli-acrilamida, a 12% ou 8%, não desnaturante. Obtiveram-se autoradiografias por exposição do gel a um filme fotográfico (XAR-Kodak) à temperatura ambiente durante uma noite. A percentagem de mtDNA mutado foi determinada por densitometria num densitómetro (*GS-700 - BioRad*) e os resultados analisados pelo *software Multi-Analyst (BioRad)*.

2. A sequenciação automática de alguns genes mitocondriais, de *assembly* e nucleares, foi efectuada num

ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) (Quadro III). A preparação da amostra para sequenciação automática inicia-se pela realização de uma PCR simétrica e purificação do amplificado (remoção de dNTPs e excesso de oligonucleotídeos) através de uma electroforese do amplificado num gel de agarose a 2% em 1xTAE com brometo de etídio. As amostras purificadas foram submetidas a sequenciação cíclica, utilizando-se uma mistura comercial (*Perkin-Elmer, Applied Biosystems*) que possui dNTPs, ddNTPs marcados com 4 fluorocromos distintos, tampão e uma DNA-polimera-se. Os fragmentos sintetizados (produtos da PCR assimétrica) foram purificados. A preparação final para injeção no *ABI PRISM* envolveu a recuperação do precipitado com 30µl de uma mistura (TSR) com características desnaturantes e elevada viscosidade (*Perkin-Elmer, Applied Biosystems*).

3. A análise de fragmentos foi utilizada neste trabalho na realização de estudos de *linkage*, numa família com défice do complexo III da CRM. Foi utilizado um *kit de linkage* para o cromosoma X (*Linkage Mapping set version 2 - painel 28 - Applied Biosystems*), o qual possui 18 marcadores bastante polimórficos (*CA-repeats*), marcados com fluorescência e distanciados de 10cM. A separação e análise dos fragmentos foi realizada num *ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)* com o programa *Gene Scan 2.1*.

4. Para o *Southern-blot* utilizou-se o método de marcação por quimiofluorescência. O DNA total muscular foi digerido por endonucleases de restrição. Os fragmentos obtidos foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose a 0,8%. Posteriormente, o gel foi desnaturado e neutralizado, fez-se a transferência durante a noite para uma membrana de *nylon (Zeta-probe BioRad)*, fixando-se de seguida o DNA à membrana. Procedeu-se à hibridização durante a noite com uma sonda de mtDNA total humano, previamente desnaturada, marcada com Fluoresceína-11-dUTP (FI-dUTP) (*Gene Images Random Prime Labelling Modu-*

Quadro II - Mutações pontuais do mtDNA, já descritas na literatura, pesquisadas por PCR-RFLP.

| Patologia | Mutação pontual no mtDNA | Referência bibliográfica |
|---------------|---------------------------------|--------------------------|
| MELAS | A3243G - (tRNA ^{Leu}) | [17] |
| | T3271C - (tRNA ^{Leu}) | [18] |
| MERRF | A8344G - (tRNA ^{Lys}) | [19] |
| | T8356C - (tRNA ^{Lys}) | [20] |
| NARP/ MILS | T8993G - (ATPase6) | [21] |
| | T8993C - (ATPase6) | [22] |
| | T8851C - (ATPase6) | [23] |
| | T9176C - (ATPase6) | [24] |
| | T9176G - (ATPase6) | [25] |
| LHON | G3460A - (ND1) | [26] |
| | G11778A - (ND4) | [27] |
| | T14484C - (ND6) | [28] |
| | A14495G - (ND6) | [29] |

Quadro III – Genes pesquisados por sequenciação automática.

| Genes | |
|--------------------------|--|
| Mitocondriais | tRNAs (Phe, Val, Leu ^(UUR) , Ile, Gln, Met, Trp, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser ^(UCN) , Asp, Lys, Gly, Arg, His, Ser ^(AGY) , Leu ^(CUN) , Glu, Thr, Pro). Cit b COX I, II, III |
| Assembly (complexo IV) | SURF1 SCO2 SCO1 COX 10 |
| Assembly (complexo III) | BCS1L |
| Nucleares (complexo III) | CyC1 UQCRB UQCRC1 UQCRC2 UQCRFS1 UQCRH |

le - Amersham Pharmacia Biotech). A revelação da membrana foi feita com o substrato estável, dióxetano. Por último a membrana foi exposta a um filme fotográfico durante cerca de 30 minutos e as determinações densitométricas dos sinais de hibridização nas autorradiografias foram efectuadas usando um densitómetro (GS-700 – BioRad).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo fez-se a investigação molecular, ao nível do mtDNA e nDNA, em 20 doentes portugueses, sendo 12 do sexo masculino e 8 do sexo feminino, com idades compreendidas entre os dois e os 66 anos. Partiu-se da análise de vários fenótipos clínicos e bioquímicos, sugestivos de patologia mitocondrial, para

a caracterização dos genótipos associados, de modo a estabelecer um diagnóstico preciso destas patologias. A caracterização molecular dos 20 doentes com citopatia mitocondrial propostos para este estudo foi realizada com êxito em 14/20 (70%) dos pacientes (Quadro IV).

1. Mutações no mtDNA

Foi encontrada positividade, em 10 dos 20 pacientes estudados, quer para mutações pontuais patogénicas já descritas na literatura, quer para deleções ao nível da molécula de mtDNA. Num paciente com fenótipo de MELAS e RRFs detectou-se a mutação pontual patogénica A3243G no tRNA^{Leu(UUR)}. Noutros dois com fenótipo de MERRF, o genótipo associado foi a mutação pontual patogénica presente no tRNA^{Lys}, a A8344G. Em três pacientes com fenótipo de LHON, foram encontradas três mutações pontuais patogénicas diferentes, a G11778A, T14484C e G15257A, presentes nos genes ND4, ND6 e citocromo b, respectivamente. O paciente portador da mutação G15257A, possuía associadas mais duas mutações secundárias, a G13708A e a G15812A. Uma outra mutação, T8993G, presente no gene ATPase 6, estava presente num paciente que não apresentava um fenótipo típico de NARP, mas sim uma encefalopatia mioclónica progressiva.

Três pacientes possuíam deleções ao nível do mtDNA. Um deles com KSS, era portador da deleção mais comum do mtDNA, de 4977pb, que se estende desde o gene da ATPase 8 até ao gene ND5. Os outros dois apresentavam deleções múltiplas de vários tamanhos: 3901pb, 3977pb, 4977pb e 8025pb, um deles com miopatia mitocondrial e RRFs e outro com fenótipo de PEO (Figura 1).

Em quatro pacientes foram encontradas cinco novas mutações nos genes dos tRNAs com relevância patogénica ainda a esclarecer (Figura 2). Os critérios utilizados neste estudo para estabelecer a possível patogenicidade de mutações ao nível do mtDNA foram: i) heteroplasmia, ii) ausência de positividade, para a respectiva mutação pontual, em 100 controlos normais, iii) conservação filogenética do nucleótido afectado, iv) défice de um ou vários complexos da CRM,

Quadro IV – Dados clínicos e moleculares dos doentes estudados.

| Paciente | Idade de diagnóstico (anos) | Sexo | Fenótipo clínico | História familiar | Mutações/deleções | Localização mtDNA | nDNA | % mutado |
|----------|-----------------------------|------|---|-------------------|-------------------------------|--|-------------------------|-------------|
| 1 | 5 | M | Tetraparésia; falta de forças | HM | A12172G | tRNA ^{His} | ----- | 100% |
| 2* | 44 | M | Ptose palpebral bilateral; atrofia muscular | -- | T5775C | tRNA ^{Cys} | ----- | 100% |
| 3 | 56 | F | D. mitocondrial | -- | C4375T T14728C | tRNA ^{Gln} tRNA ^{Glu} | ----- ----- | 100% 97% |
| 4 | 45 | M | D. neurológica | X | -- | ----- | CrX | -- |
| 5* | 27 | M | D. mitocondrial; AVCs | -- | -- | ----- | ----- | -- |
| 6* | 57 | F | Miopatia metabólica | -- | -- | ----- | ----- | -- |
| 7 | 5 | F | Miopatia | -- | A5711G | tRNA ^{Asn} | ----- | 100% |
| 8 | 65 | M | KSS | -- | Δ comum | (1) | ----- | -- |
| 9 | 29 | F | Encefalomiopatia progressiva | -- | T8993G | ATPase6 | ----- | 86% |
| 10 | 22 | F | AVCs | HM | A3243G | tRNA ^{Leu} | ----- | 90% |
| 11 | 33 | F | Tetraparésia; MERRF | HM | A8344G | tRNA ^{Lys} | ----- | 92% |
| 12 | 43 | M | Atrofia óptica; LHON (?) | HM | G15257A G13708A G15812A | cit b ND5 Cit b | ----- ----- ----- | 100% |
| 13 | 66 | M | PEO | -- | Δ múltiplas | (2) | ----- | -- |
| 14 | 35 | M | Perda bilateral da visão; LHON (?) | -- | T14484C | ND6 | ----- | 100% |
| 15 | 39 | M | MERRF | HM | A8344G | tRNA ^{Lys} | ----- | 92% |
| 16 | 65 | F | Miopatia mitocondrial | -- | Δ simples | (3) | ----- | -- |
| 17 | 25 | M | LHON | -- | G11778A | ND4 | ----- | 100% |
| 18 | 17 | M | MNGIE | -- | -- | ----- | ----- | -- |
| 19 | 2 | F | Síndrome de Leigh | -- | A745G/N | ----- | SURF1 | -- |
| 20 | 7 | M | Síndrome de Leigh | -- | G551C/N | ----- | SURF1 | -- |

Abreviaturas: (F) feminino; (M) masculino; (%) % mtDNA mutado no músculo esquelético; (A) anos; (Δ) deleção; (–) não identificado; (1) Δ 4977pb: ATPase8-ND5; (2) Δ 8025pb: tRNA^{Asp}-cit b, Δ3901pb: ATPase8-tRNA^{Leu} e Δ 4977 pb: ATPase8-ND5; (3) Δ 3977pb: ATPase8-ND5; (AVC) acidente vascular cerebral; (KSS) síndrome de Kears-Sayre; (PEO) oftalmoplégia externa progressiva; (MERRF) epilepsia mioclónica com fibras rotas e vermelhas; (LHON) neuropatia óptica hereditária de Leber; (MNGIE) encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial; (HM) hereditariedade materna; (X) hereditariedade ligada ao X; (CrX) cromossoma X; (*) Défice da ubiquinona.

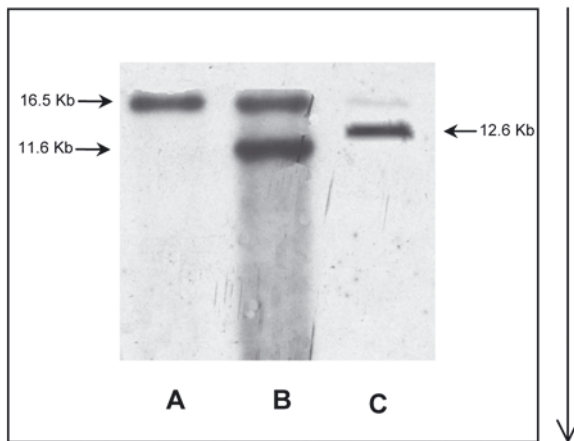


Figura 1. i) – Secção de autorradiografias representativa de deleções no mtDNA de diferentes tamanhos. (A) controlo negativo; (B) deleção de 4977pb; (C) deleção de 3977 pb.

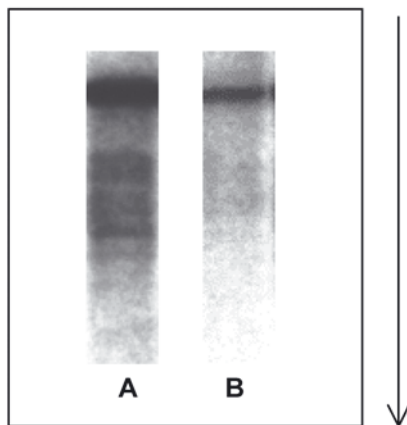


Figura 1. ii) – Secção de autorradiografias representativa de deleções múltiplas no mtDNA. (A) P13 - caso positivo; (B) controlo negativo.

v) alterações na histologia e vi) fenótipo clínico sugestivo de doença mitocondrial. A patogenicidade das mutações homoplásmicas pode ser nula, se for observada a presença da mesma mutação homoplásmica em familiares saudáveis da linha materna.

Apenas uma das novas mutações encontrada no tRNA^{Glu} (T14728C), ocorreu em heteroplasmia (97% de mtDNA mutado). Todas as outras eram homoplásmicas, embora tivesse sido encontrada positividade em duas destas mutações homoplásmicas (A12172G e T5775C, presentes nos tRNAs His e Cys, respectivamente), em dois irmãos com fenótipo semelhante ao dos pacientes

que as expressavam. Após pesquisa das cinco novas mutações, em 100 controlos normais, não foi detectada positividade em qualquer das mutações.

Os nucleótidos afectados apresentavam elevado grau de conservação (90-100%), apenas em três das cinco mutações encontradas (A12172G, C4375T e T14728C, presentes nos tRNAs His, Gln e Glu, respectivamente), nas restantes duas (A5711G e T5775C) mutações não foi possível averiguar o grau de conservação dos nucleótidos afectados. Só dois dos quatro pacientes portadores das mutações (A12172G e T5775C, dos tRNAs His e Cys, respectivamente) apresentavam défice do complexo IV da CRM,

possuindo os restantes uma actividade normal dos complexos da CRM.

Nos estudos histológicos, foi detectada a presença de RRFs em três pacientes, e fibras COX negativas nos pacientes que revelaram défice do complexo IV da CRM.

Os fenótipos clínicos de todos os pacientes eram sugestivos de patologia mitocondrial, e variavam desde a miopatia, ptose palpebral bilateral, atrofia dos músculos proximais dos membros superiores, à tetraparésia e falta de forças.

2. Mutações no nDNA

A maioria dos pacientes estudados, apresentavam défices isolados da COX. Como, até ao momento, só foram descritas mutações nas quatro proteínas envolvidas no correcto *assembly* da COX: SURF1, SCO2, SCO1 e COX10, não tendo sido ainda descritas quaisquer mutações nas subunidades da COX codificadas pelo nDNA, procedeu-se em primeiro lugar à investigação de possíveis alterações nas proteínas envolvidas na *assembly* da COX.

Os dois doentes incluídos neste estudo com apresentação clínica compatível com síndrome de Leigh (SL), revelaram-se heterozigóticos para duas mutações presentes no gene do *assembly* da COX, SURF1. Estas mutações, G551C e A745G encontravam-se nos exões 6 e 7, respectivamente. A primeira mutação origina a substituição de um resíduo de arginina por um de treonina, enquanto que na segunda ocorre a substituição de um resíduo de asparagina por um de ácido aspártico. Embora as duas mutações sejam sugestivas de causar a patologia, devido à sua localização exónica, ainda não foi encontrada a segunda mutação responsável por este fenótipo. O défice da COX, é o défice bioquímico mais frequentemente associado ao SL, contudo não foi possível a determinação da actividade dos complexos enzimáticos da CRM, nestes dois pacientes, devido ao facto de não dispormos de biópsia muscular para efectuar este estudo.

3. Défice da ubiquinona ou CoQ₁₀

O diagnóstico de défice da ubiquinona ou CoQ₁₀, foi efectuado em dois

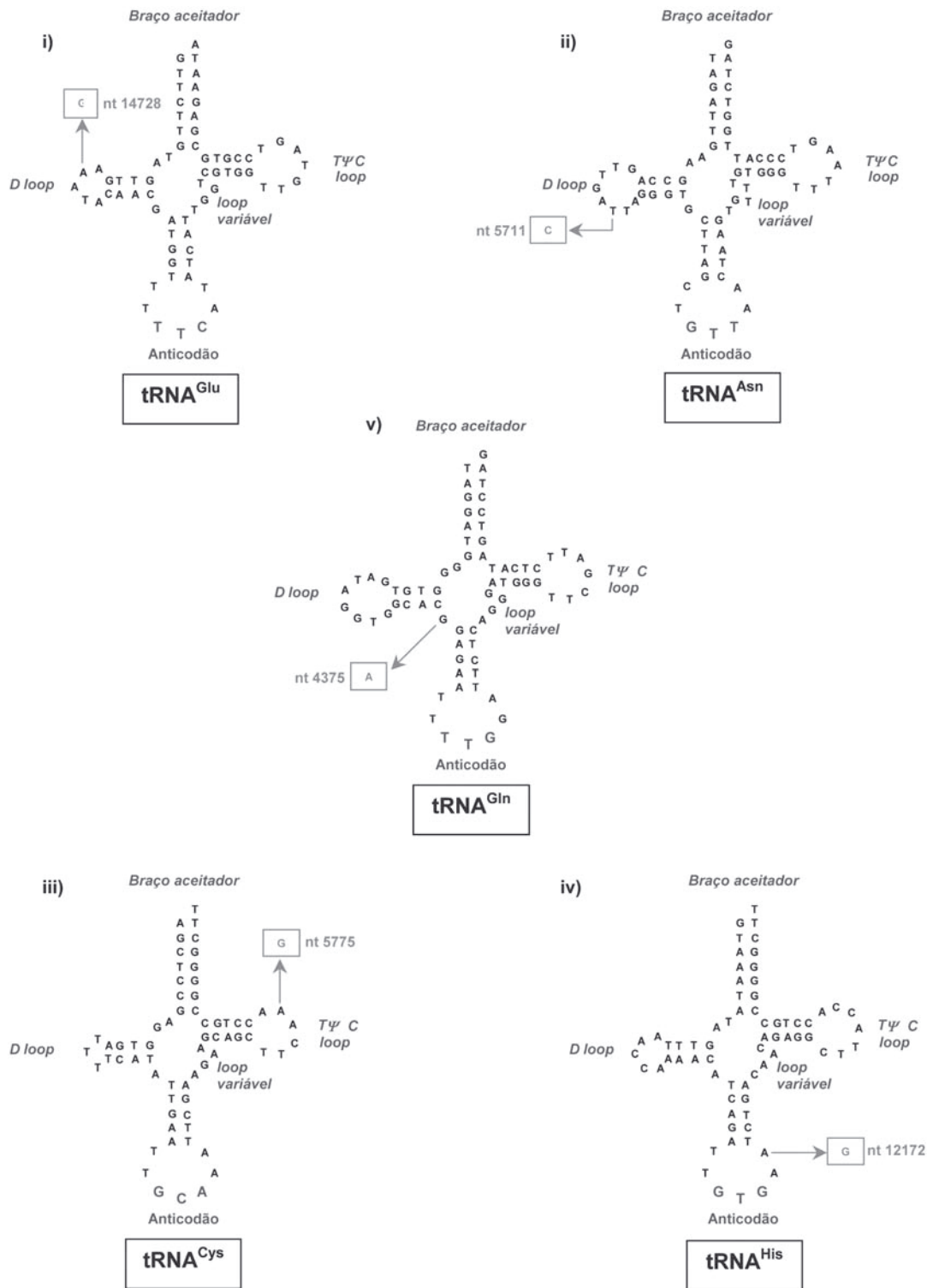


Figura 2. i) – Estrutura em folha de trevo do tRNA^{Glu} (localizado na cadeia leve do mtDNA, pelo que possui uma sequência complementar à sequência de *Cambridge* do mtDNA). Representação da nova mutação (T14728C) detectada neste estudo. Abreviaturas: nt – nucleótido. ii) – Estrutura em folha de trevo do tRNA^{Asn} (localizado na cadeia leve do mtDNA, pelo que possui uma sequência complementar à sequência de *Cambridge* do mtDNA). Representação da nova mutação (A5711G) detectada neste estudo. iii) – Estrutura em folha de trevo do tRNA^{Cys} (localizado na cadeia leve do mtDNA, pelo que possui uma sequência complementar à sequência de *Cambridge* do mtDNA). Representação da nova mutação (T5775C) detectada neste estudo. iv) – Estrutura em folha de trevo do tRNA^{His}. Representação da nova mutação (A12172G) detectada neste estudo. v) – Estrutura em folha de trevo do tRNA^{Gln} (localizado na cadeia leve do mtDNA, pelo que possui uma sequência complementar à sequência de *Cambridge* do mtDNA). Representação da nova mutação (C4375T) detectada neste estudo.

pacientes (P2 e P6) que reagiram com sucesso à terapêutica com ubiquinona, encontrando-se em curso os ensaios terapêuticos no terceiro paciente (P5). Esta deficiência, a nível muscular, reflecte-se numa baixa actividade do complexo II+III da CRM, o que foi comprovado nestes três pacientes. Fenotipicamente todos eles apresentavam uma forma miopática característica destes défices, e no estudo miopatológico, dois deles revelaram a presença de acumulações lipídicas, tendo sido detectadas, apenas num deles, RRFs.

Não foi possível caracterizar molecularmente estes pacientes, devido ao gene envolvido nesta doença ainda não ter sido identificado. Por este motivo, o método mais indicado para a confirmação bioquímica deste diagnóstico, será a quantificação da CoQ₁₀ por HPLC, o que está actualmente em curso.

4. Estudos familiares

Qualquer tipo de hereditariedade pode estar associada às citopatias mitocondriais, mas a hereditariedade materna é particular do genoma mitocondrial e é um dado muito importante na investigação destas patologias, sendo por vezes difícil de comprovar devido à grande heterogeneidade fenotípica destes doentes, em particular dos oligossintomáticos.

Houve suspeita de uma hereditariedade materna em 25% dos doentes presentes neste estudo, mas só foi possível o estudo em nove indivíduos, familiares de cinco pacientes com mutações pontuais no mtDNA.

Num dos pacientes com a mutação A8344G ao nível do tRNA^{lys} e no que apresentava a mutação G15257A no gene mitocondrial do citocromo b, foram estudadas a mãe e o irmão, tendo sido positivos para ambas as mutações, o que confirma a transmissão materna. No outro paciente também com a mutação A8344G no tRNA^{lys}, assim como noutros dois, com novas mutações nos genes dos mtRNAs de relevância patogénica ainda desconhecida (A121721G e T5775C, presentes nos tRNAs His e Cys, respectivamente), apenas os irmãos foram estudados, revelando-se todos eles positivos para as mutações pesquisadas,

sugerindo também uma possível hereditariedade materna.

Por último numa família de três irmãos do sexo masculino com défice do CIII da CRM, semelhante em termos de actividade residual, outro tipo de hereditariedade parece estar associada. Após exclusão de positividade nos genes nucleares e de *assembly* deste complexo, e por não haver consanguinidade entre os progenitores, a hipótese de se tratar de uma doença autossómica recessiva não foi totalmente posta de parte, mas o facto de não haver nenhum indivíduo do sexo feminino afectado e dos irmãos afectados apresentarem alterações psiquiátricas, pareceu indicativo de se tratar de uma hereditariedade ligada ao cromossoma X.

Procedeu-se por este motivo ao estudo de *linkage* ao nível do cromossoma X, com o objectivo de se encontrar o gene envolvido na patologia.

Até ao momento, a análise automática de fragmentos resultante da amplificação de 18 marcadores do cromossoma X, foi informativa para os marcadores DXS987 e DXS1226. O estudo revelou que a mãe e a irmã do caso índice são portadoras dos alelos 214 e 295 dos *locus* DXS987 e DXS1226, respectivamente, enquanto que os três irmãos afectados são hemizigóticos para estes dois alelos. Embora as portadoras dos alelos mutantes não revelem a patologia, transmitem-na aos seus descendentes, sendo os indivíduos do sexo masculino severamente afectados. Isto torna possível prever que estaremos perante uma doença autossómica recessiva ligada ao cromossoma X.

Estudos mais aprofundados terão de ser realizados no futuro, de modo a descobrir qual o gene envolvido nesta patologia, o que traria grandes avanços quer ao nível da investigação clínica (uma vez que os défices dos complexos enzimáticos da CRM ligados ao cromossoma X são extremamente raros), quer ao nível do diagnóstico, podendo este ser oferecido às famílias afectadas.

CONCLUSÃO

As citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças com um largo

espectro de sintomas e sinais, devidas ao anormal funcionamento metabólico da mitocôndria, em larga escala atribuídos a alterações do mtDNA.

A diversidade na expressão fenotípica associada às mutações no mtDNA, não se encontra presente nas patologias mitocondriais de hereditariedade mendeliana, pois estas causam fenótipos clínicos distintos, tais como: SL ou cardioencefalomiopatia fatal infantil.

Mutações pontuais e deleções ao nível do mtDNA são encontradas em aproximadamente 1/3 das citopatias mitocondriais, quer em adultos, quer em crianças, devendo por este motivo, ser feito em primeiro lugar, um estudo a este nível. Pelo contrário, mutações no nDNA, são a principal causa de deficiências da CRM em recém-nascidos e em crianças.

A descoberta de genes nucleares relacionados com doenças mitocondriais, pode explicar a raridade (10%) de mutações do mtDNA encontradas na população infantil, e a possibilidade de um diagnóstico molecular preciso, nestas idades.

i) Estratégias terapêuticas

Actualmente não existe uma terapia eficaz para as doenças mitocondriais⁽¹⁰⁾, à excepção do défice da ubiquinona, que é a única doença mitocondrial tratável, uma vez que este défice primário responde à terapêutica com CoQ₁₀ com regressão dos sintomas. Isto deve-se quer à falta de animais modelo, quer à heterogeneidade destas doenças. Contudo, inúmeras medidas, tais como melhorias na alimentação, implantação de *pace-makers*, correcções cirúrgicas de ptose, tratamento de convulsões, correcção da acidose láctica, etc, foram tomadas com vista a melhorar a qualidade de vida destes doentes⁽¹¹⁾.

A terapia metabólica é a mais utilizada, tendo sido a creatina um dos últimos compostos indicados para o tratamento destas doenças, pois funciona como substrato na síntese de fosfocreatina, o componente energético armazenado mais abundante no músculo, cérebro e coração. Esta substância, é eficaz em algumas, mas não em todas as doenças mitocondriais. Tem como finalidade o au-

mento da força muscular, e está isenta de efeitos secundários⁽¹²⁾.

A CoQ₁₀ ou ubiquinona tem sido administrada em doentes com grande heterogeneidade fenotípica, podendo actuar como i) transportador de electrões para o complexo III, a partir dos complexos I e II assim como da β-oxidação dos ácidos gordos e dos aminoácidos ramificados via FADH₂, ii) estabilizador membranar e iii) antioxidante⁽¹³⁾.

A idebenona, é um análogo da CoQ₁₀ de cadeia curta, tem função antioxidante e protege a mitocôndria da acção dos radicais livres. Tem sido eficaz no tratamento da ataxia de Friedreich, uma vez que a frataxina participa na utilização do ferro para construir os complexos da CRM, levando a sua deficiência à acumulação de ferro, e consequentemente à formação de radicais livres, que resultaria numa destruição dos complexos da CRM⁽¹⁴⁾.

A terapia vitamínica apesar de na maioria dos casos, não ser muito eficaz, é também bastante utilizada, nomeadamente as vitaminas do complexo B (Tiamina - vitamina B1, Riboflavina - vitamina B2 e Niacinamida - vitamina B3) e as do complexo E. Trata-se de uma terapia muito económica, sendo as vitaminas do complexo B, componentes essenciais para a função de inúmeras enzimas relacionadas com a produção de energia, enquanto que as do complexo E funcionam como antioxidantes, evitando que os radicais livres danifiquem os lípidos membranares, como por exemplo os da membrana mitocondrial interna⁽¹⁵⁾.

ii) Aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal

O diagnóstico pré-natal destas patologias raramente é efectuado⁽¹⁶⁾, se envolve mutações no genoma mitocondrial, porque a percentagem de mtDNA mutado nos amniócitos pode não ser idêntica à dos outros tecidos fetais, pode variar ao longo da gravidez e pode ainda aumentar após o nascimento, devido à segregação mitótica. Esta característica explica a falta de fiabilidade deste diagnóstico e a importância de um aconselhamento genético a estas famílias.

Contudo, quando a mutação causal é conhecida e está localizada ao nível dos genes nucleares que codificam subunidades da CRM, pode oferecer-se um diagnóstico pré-natal ao casal de risco.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. António Guimarães e ao Dr. Melo Pires da Neuropatologia do HGSA pela disponibilidade dos dados miopatológicos referentes aos doentes estudados. A todos os clínicos que enviaram as amostras para serem estudadas no nosso laboratório.

MOLECULAR INVESTIGATION IN 20 PATIENTS WITH MITOCHONDRIAL CYTOPATHIES

ABSTRACT

Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain has been recognized as a cause of a large, and diverse group of multisystemic disorders for over 30 years. Respiratory chain diseases may develop at any time from the neonatal period to late adult life. Although tissues with a high demand for oxidative phosphorylation such as brain and skeletal muscle are frequently affected, virtually any tissue can be involved. Because of that, multisystemic mitochondrial diseases are often referred to as mitochondrial encephalomyopathies, or in a larger concept, as mitochondrial cytopathies.

For more than a decade, the search for pathogenic mutations in human diseases due to respiratory chain dysfunction has been focused on the mitochondrial genome (mtDNA). In the past few years, the focus of attention has shifted to the search for mutations within the nuclear DNA (nDNA).

Objectives: The scope of this project was to study at a molecular level patients who had clinical presentations or laboratory features suggestive of mitochondrial cytopathies.

Patients and Methods: We studied 20 patients from all the country with mitochondrial dysfunctions. We investigated: i) the most frequent mutations in the mtDNA already described in the literature, pontual mutations and deletions. ii) mutations in

mt-tRNAs genes and in structural mtDNA genes. iii) mutations in nuclear genes that encode structural subunits of respiratory chain and that are needed for the assembly of these subunits.

Results: Ten of these 20 patients revealed pathogenic mtDNA point mutations (in tRNA and structural genes), large-scale and multiple mtDNA deletions, already described in the literature. Other four showed five new mutations in the tRNA genes, whose pathogenesis is still unknown. Ubiquinone deficiency was suspected in three of these 20 patients, confirmed by therapeutic tests in two of them. In two patients with Leigh syndrome two new mutations were detected in the COX assembly gene (SURF1). *Linkage* analysis around the X chromosome has been performed in a patient's family who presented a deficiency of complex III of the respiratory chain, aiming to identify the pathological involved gene.

Conclusions: In this study we started from different clinic and biochemic phenotypes suggestive of mitochondrial disease, to characterize the associated genotypes, with the aim to establish the molecular cause of these disorders. The molecular characterization of the 20 patients with mitochondrial cytopathies included in this study was done with success in 14/20 (70%) of them.

Key-words: mitochondrial respiratory chain, OXPHOS, tRNAs, mtDNA, nDNA.

Nascer e Crescer 2005; 14(4): 277-285

BIBLIOGRAFIA

1. DiMauro S. Mitochondrial Diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658 (1-2): 80-88.
2. DiMauro S, Rosenberg RN and Prusiner SB. Mitochondrial Encephalomyopathies. *Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* 1993; 665-694.
3. Thornburn DR. Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *J Inher Metab Dis.* 2004; 27(3):349-362.

4. DiMauro S, Schon E. Mitochondrial DNA and diseases of the nervous system: the spectrum. *Neuroscientist* 1998; 4: 53-63.
5. Hanna MG and Nelson IP. Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases. *Cell Mol Life Sci. Rev.* 1999; 55(5):691-706.
6. DiMauro S. Mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659(2-3):107-114.
7. Shoubridge EA. Nuclear genetic defects of oxidative phosphorylation. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(20): 2277-84. Review.
8. Hirano M, DiMauro S. ANT1, Twinkle, POLG, and TP: New genes open our eyes to ophthalmoplegia. *Neurology* 2001; 26:57(12): 2163-5.
9. Coenen MJ Van den Heuvel LP and Smeitink J A. Mitochondrial oxidative phosphorylation system assembly in man: recent achievements. *Curr Opin Neurol.* 2001; Dec 14 (6): 777-81.
10. DiMauro S, Mancuso M and Naini A. Mitochondrial Encephalomyopathies: therapeutic approach. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 232-245.
11. Zeviani M and Klopstock T: Mitochondrial disorders. *Current opinion in Neurology* 2001; 14: 553-560.
12. Klopstock T Querner V and Schmidt F: A placebo-controlled crossover trial of creatine in mitochondrial diseases. *Neurology* 2000; 55: 1748-1751.
13. Musumeci O, Naini A, Slonim AE, Skavin N, Hadjigeorgiou G L, Krawiecki N, et al. Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 2001; 10;56(7): 849-55.
14. Rustin P, Von Kleist-Retzow JC and Chantrel-Groussard K: Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet* 1999; 354: 477-479.
15. Cohen MD and Gold DR. Mitochondrial cytopathy in adults: what we know so far. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2001; 68(7):625-642.
16. White SL, Shanske S, Biros I, Warwick L, Dahl HM, Thorburn DR, DiMauro S. Two cases of prenatal analysis for the pathogenic T to G substitution at nucleotide 8993 in mitochondrial DNA. *Prenat Diagn* 1999; 19(12):1165-1168.
17. Goto Y, Nonaka I and Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348:651.
18. Goto Y. Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve* 1992; 3: 107-112.
19. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW and Wallace DC: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990; 61(6): 931-937.
20. Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh S J, and DiMauro S. A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992; 51(6): 1213-1217.
21. Holt IJ, Harding AE and Petty RKH. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 428-483.
22. De Vries DD, Van Engelen BGM, Gabreels FJM, Ruitenbeek W and Van Oost B A. A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann. Neurol.* 1993; 34: 410-412.
23. De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, Schoenjes E and Desprechins B: Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene. *Pediatr Neurol.* 1995; 13 (3):242-246.
24. Thyagarajan D, Shanske S and Vasquez-Memije ME. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* 1995; 38:418.
25. Carozzo R, Murray J, Capuano O, Tessa A, Chichierchia G, Neglia MR, Capaldi RA and Santorelli FM. A novel mtDNA mutation in the ATPase 6 gene studied by E. coli modeling. *Neurol Sci* 2000; 21(5 Suppl):S983-4.
26. Huoponen K, Viikki J, Aula P, Nikoskelainen E K, and Savontaus M L. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 1991; 48(6):1147-1153.
27. Wallace DC, Singh G and Lott MT. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242:1427-1430.
28. Johns DR, Neufeld MJ and Park RD. An ND6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:1551.
29. Jun AS, Brown MD and Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at np 14459 of the ND6 gene associated with maternally inherited Leber's hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(13):6206-6210.

Correspondência:

Doutora Laura Vilarinho
Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães
Praça Pedro Nunes, 88
4099-028 Porto
Tel: 226 070 306 Fax: 226 070 399
laura.vilarinho@igm.min-saude.pt