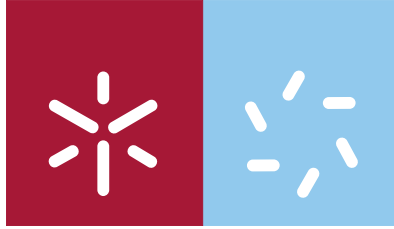


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ana Sofia Teixeira Esteves

**Depleção do DNA mitocondrial - Estudo  
de 14 doentes**



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ana Sofia Teixeira Esteves

**Depleção do DNA mitocondrial - Estudo  
de 14 doentes**

Tese de Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efectuado sob a orientação da  
**Doutora Laura Vilarinho**  
e da  
**Professora Doutora Cândida Lucas**

Outubro de 2009

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Ana Sofia Teixeira Esteves

**Endereço electrónico:** [asofiaesteves@gmail.com](mailto:asofiaesteves@gmail.com) **Telefone:** 916383834

**Número do Bilhete de Identidade:** 12681276

**Título dissertação:** Depleção do DNA mitocondrial – Estudo de 14 doentes

**Orientador(es):** Professora Doutora Cândida Lucas e Doutora Laura Vilarinho

**Ano de conclusão:** 2009

**Designação do Mestrado:** Mestrado em Genética Molecular

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 30 de Outubro de 2009

Assinatura:

Ana Sofia Teixeira Esteves

Dissertação realizada sob a orientação da Doutora Laura Vilarinho do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães – INSA e Professora Doutora Cândida Lucas da Escola de Ciências da Universidade do Minho.

Este trabalho foi realizado na Unidade de Investigação e Desenvolvimento, do Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães - INSA, Porto.

## Agradecimentos

Este trabalho contou com a colaboração e apoio de muitas pessoas que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a sua concretização. A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Contudo, gostaria de agradecer de uma forma especial:

À Doutora Laura Vilarinho, por me ter proporcionado e incentivado na realização deste trabalho. Agradeço a oportunidade, todos os conhecimentos que me transmitiu, toda a confiança que depositou nas minhas capacidades, a autonomia que me deu e a disponibilidade prestada.

À Professora Doutora Cândida Lucas, pela colaboração prestada, disponibilidade e amabilidade que teve comigo. Agradeço todas as sugestões e conselhos que contribuíram para uma melhoria significativa deste trabalho.

À Célia... Nada seria suficiente para agradecer todas as horas que perdeu, lendo e relendo esta tese, com o intuito de me ajudar a melhorá-la e abrihantá-la. Um obrigada muito especial por todos os conhecimentos que me transmitiu, toda a disponibilidade que teve, e tem, para me ouvir e discutir as minhas ideias, toda a amizade e carinho que sempre demonstrou e que tanto me animam e orgulham.

À Lígia (e Pedrinho) e Mariana, pelos conhecimentos transmitidos de forma clara e precisa e todas as críticas e sugestões que sempre me dispensaram ao longo da elaboração desta tese.

Ao Zé Luis C., Zé Luis, Luis e Salomé pela preciosa ajuda informática.

À Mia, Liliana S., Sérgio e Ângelo pela amizade, pela colaboração dispensada nas várias etapas deste trabalho e a quem devo bons momentos de descontração.

À Helena, Cármen, Cristina e Raquel pela amizade especial, pelos bons conselhos a nível profissional, mas também a nível pessoal, que me permitiram adquirir novas perspectivas.

À Belinha, Liliana, Natália, Francisca, Alexandre, Zita cada um com uma amizade particular, específica, mas muito especial, por me acompanharem no dia-a-dia, interessados, atentos e sempre presentes... Um obrigado especial...

**Aos meus pais**, meu eterno porto de abrigo, a quem devo tudo o que hoje sou e conquistei, pela serena e total confiança que sempre depositaram em mim e no resultado de todo o meu trabalho e esforço.

## Sumário

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 Sistema Nervoso Central (SNC) sejam os mais afectados, devido à sua elevada dependência do metabolismo energético.

O Síndrome de Depleção Mitocondrial (MDS) é um grupo clinicamente heterogéneo de doenças mitocondriais caracterizado por uma redução parcial ou total do número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA) nos tecidos afectados. O seu mecanismo patogénico está relacionado com a manutenção do *pool* de nucleótidos mitocondriais, que assume um papel crucial na replicação e integridade do mtDNA. São conhecidas três formas clínicas de MDS: miopática, hepatocerebral e encefalomiopática.

O principal objectivo deste estudo, foi a implementação das técnicas de *Southern blot* e PCR quantitativo em tempo real (qtRT-PCR), para o estudo da depleção do mtDNA, bem como o estudo molecular dos genes *DGUOK* e *TK2*, por sequenciação automática. Estes codificam enzimas mitocondriais envolvidas na síntese de mtDNA via suplemento de deoxiribonucleotídios (dNTPs). A escolha destes genes baseou-se no grande número de mutações já descritas, associadas ao MDS.

Foram estudados 14 doentes clinicamente suspeitos de MDS, tendo sido identificada uma mutação patogénica em heterozigotia no gene *DGUOK*, já descrita na literatura, num dos doentes deste estudo. Foi ainda possível identificar vários polimorfismos nos dois genes estudados, sendo que dois deles não estão descritos na literatura.

A optimização das técnicas utilizadas, permitiu concluir que o qtRT-PCR, é uma técnica mais rápida, sensível e específica que o *Southern blot*, podendo ser vantajosa para um melhor e mais preciso diagnóstico da depleção do mtDNA.

## Abstract

In the last 30 years, a large spectrum of multisystemic disorders associated with mitochondrial dysfunction, have been described, with symptoms since 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.

The Mitochondrial Depletion Syndrome (MDS) is a clinically heterogeneous group of mitochondrial diseases characterized by a reduced number of copies of mitochondrial DNA (mtDNA) in the affected tissues. Its pathogenic mechanism is related with mitochondrial nucleotide pool maintenance, which plays a crucial role in mtDNA replication and integrity. Three clinical forms of MDS are known: myopathic, hepatocerebral and encephalomyopathic.

The aim of this study was the implementation of Southern blot and Quantitative Real Time PCR (qtRT-PCR) techniques for the study of mtDNA reduction, beyond the molecular study of *DGUOK* and *TK2*, through automatic sequencing. These two genes, encode mitochondrial kinases, involved in mtDNA synthesis by supplement of deoxiribonucleotides (dNTPs). These genes were chosen because of large number of mutations already described, associated with MDS

We studied 14 patients clinically suspected of having MDS. One pathogenic mutation in heterozygosity in *DGUOK* gene already described in literature was identified. It was also possible to identify several polymorphisms in the two genes studied, two of which for the first time.

The optimization of the techniques used allowed us to conclude that qtRT-PCR is a more sensitive, fast and specific technique than Southern blot, and thus more appropriate for a better and more accurate diagnosis of mtDNA depletion.



## Índice

Agradecimentos.....	i
Sumário .....	iii
Abstract .....	iv
Glossário.....	ix
CAPÍTULO I.....	1
Introdução .....	1
1. Mitocôndria .....	3
1.1 Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação Oxidativa .....	4
1.2 Genoma Mitocondrial .....	6
2. Citopatias mitocondriais.....	7
2.1 Patologias associadas a alterações no mtDNA e/ou nDNA.....	9
2.1.1 Mutações pontuais no mtDNA.....	9
2.1.2 Mutações nos genes nucleares .....	10
2.1.3 Rearranjos de grandes dimensões .....	10
2.1.4 Mutações somáticas no mtDNA.....	11
2.1.5 Depleção mitocondrial.....	11
2.1.5.1 Mecanismo patogénico .....	12
2.1.5.2 Genética Clínica e Molecular .....	15
2.1.5.2.1 Forma miopática .....	15
2.1.5.2.2 Forma Hepatocerebral .....	16
2.1.5.2.3 Forma Encefalomiopática.....	17
CAPÍTULO II.....	19
Objectivos.....	19
CAPÍTULO III.....	23
Pacientes e Métodos .....	23
1. Pacientes.....	25
2. Métodos .....	26
2.1 Extracção de DNA.....	26
2.1.1 Extracção automática de DNA de sangue total.....	26
2.1.2 Extracção de DNA de biópsia muscular e/ou hepática (Puregene <sup>®</sup> Core kit A - QIAGEN).....	27
2.2 Southern Blot.....	27
2.3 qtRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real).....	30
2.4 Análise mutacional dos genes <i>DGUOK</i> e <i>TK2</i> .....	32
2.4.1 Análise da reacção de PCR e purificação dos produtos amplificados .....	33
2.4.2 Sequenciação dos genes <i>DGUOK</i> e <i>TK2</i> .....	35
CAPÍTULO IV .....	37
Resultados e Discussão .....	37
1. Southern blot .....	39
1.1 Delecções simples ou múltiplas .....	39
1.2 Depleção do mtDNA .....	40

2. qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real).....	41
2.1 Determinação da eficiência de amplificação.....	41
2.2 Método comparativo ou método $\Delta\Delta C_T$ para quantificação relativa.....	42
2.3 Vantagens do PCR quantitativo em tempo real, relativamente ao <i>Southern blot</i> .....	45
3. Análise mutacional dos genes <i>DGUOK</i> e <i>TK2</i> .....	46
CAPÍTULO VI .....	49
Conclusão e Perspectivas futuras .....	49
CAPÍTULO VII.....	53
Bibliografia.....	53
CAPÍTULO IX.....	61
Anexos.....	61
Anexo I. Protocolos de extracção de DNA.....	63
Anexo I.1. Extracção de DNA de sangue total ou <i>buffy coat</i> (QIAamp DNA Mini Kit – QIAGEN) .....	63
Anexo I.2. Extracção de DNA de biópsia muscular e/ou hepática (Puregene® Tissue Kit - GENTRA).....	65
Anexo II. Southern Blot .....	67
Anexo II.1. Soluções .....	67
Anexo II.2. Preparação da sonda ( <i>Kit GE – Healthcare RPN3680</i> ).....	69
Anexo II.3. Reutilização da membrana ( <i>Stripping</i> ) .....	70
Anexo III. Previsão dos locais de <i>splicing</i> para as novas alterações identificadas nos genes <i>DGUOK</i> e <i>TK2</i> , através do programa bioinformático <i>NetGene2</i> .....	71

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da mitocôndria, e da localização das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) e outras vias metabólicas importantes (adaptado de <a href="http://www.awl.com/mathews/ch01/frames.htm">http://www.awl.com/mathews/ch01/frames.htm</a> )....	3
<b>Figura 2.</b> Complexos enzimáticos da CRM. ....	5
<b>Figura 3.</b> Representação do genoma mitocondrial humano .....	7
<b>Figura 4.</b> Heterogeneidade dos órgãos afectados por citopatias mitcondriais [6].	8
<b>Figura 5.</b> Via de síntese de deoxiribonucleotídeos (dNTP) no citosol e na mitocôndria. A verde encontram-se os genes associados ao MDS ou a mutações no mtDNA. (adaptado de Copeland, 2008 [24]).....	13
<b>Figura 6.</b> <i>Southern blot</i> dos doentes 1 e 9 para pesquisa de deleções simples e múltiplas. ....	39
<b>Figura 7.</b> <i>Southern blot</i> dos doentes 1 e 9 para pesquisa de depleção do mtDNA. C-: Controlo negativo para depleção mitocondrial. Nota: A imagem para cada doente corresponde a experiências independentes. ....	40
<b>Figura 8.</b> Comparação da eficiência de amplificação do qRT-PCR para o gene de interesse ( <i>MT-ND1</i> ) e para o gene de referência ( <i>rRNA 18s</i> ). A diferença das eficiências foi determinada através do declive da linha de tendência. ....	42
<b>Figura 9.</b> Nº de cópias relativo do mtDNA dos doentes em relação ao valor médio dos controlos. ....	44
<b>Figura 10.</b> Previsão dos locais de <i>splicing</i> para a região exão7 – intrão7 do gene <i>DGUOK</i> normal (A) e com a alteração IVS7+13 A>T (B).....	71
<b>Figura 11.</b> Previsão dos locais de <i>splicing</i> para a região intrão9 – exão10 do gene <i>TK2</i> normal (A) e com a alteração IVS9-13 G>A (B).....	72

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Dados clínicos e/ou bioquímicos dos 14 pacientes deste estudo. ....	25
<b>Tabela 2.</b> Localização e sequência dos <i>primers</i> das sondas de mtDNA e nDNA... 27	
<b>Tabela 3.</b> <i>Primers</i> e condições utilizadas na reacção de qtRT-PCR. ....	32
<b>Tabela 4.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos dos genes <i>DGUOK</i> e <i>TK2</i> e suas condições de PCR. ....	34
<b>Tabela 5.</b> Mistura de reacção utilizada no PCR de sequenciação. ....	35
<b>Tabela 6.</b> Condições do PCR de sequenciação. ....	36
<b>Tabela 7.</b> Conteúdo de mtDNA, expresso em percentagem, obtido pela técnica de <i>Southern blot</i> . ....	41
<b>Tabela 8.</b> Conteúdo de mtDNA, expresso em percentagem, obtido pela técnica de qtRT-PCR. ....	44
<b>Tabela 9.</b> Alterações encontradas neste estudo, no gene <i>DGUOK</i> . ....	46
<b>Tabela 10.</b> Alterações encontradas neste estudo, no gene <i>TK2</i> . ....	46
<b>Tabela 11.</b> Reagentes utilizados para <i>Southern Blot</i> . ....	67

## Glossário

**ADP** – Adenosina-5'-difosfato

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**ATPase 6 e 8** – ATP sintetase 6 e 8

**bp** – pares de bases

**cDNA** – DNA complementar

**CK** – Creatina cinase

**CoA** – Coenzima A

**CoQ** – Coenzima Q ou Ubiquinona

**COX 1** – Citocromo c oxidase subunidade 1

**COX 2** – Citocromo c oxidase subunidade 2

**COX 3** – Citocromo c oxidase subunidade 3

**CPEO** – Oftalmoplegia Externa Progressiva Crónica

**CRM** – Cadeia Respiratória Mitoncondrial

**C<sub>T</sub>** – Ciclo *threshold*

**DAD** – Diabetes e Surdez

**ddH<sub>2</sub>O** – água bidestilada

**ddNTPs** – Dideoxiribonucleotídeos-5'-trifosfato

**DGUOK** – *Deoxyguanosine Kinase*

**DNA** – Ácido Desoxiribonucleico

**dNTP** – Deoxiribonucleotídeos-5'-trifosfato

**E** – Eficiência de amplificação

**F** – Primer *Forward*

**FAD** – Forma oxidada do dinucleótido de flavina e adenina

**FADH<sub>2</sub>** – Forma reduzida do dinucleótido de flavina e adenina

**gDNA** – DNA genómico

**KSS** – Síndrome de Kearns-Sayre esporádico

**LHON** – Neuropatia Óptica Hereditária de Leber

**MDS** – Síndrome de Depleção Mitochondrial

**MELAS** – Encefalomiopatia Mitochondrial com acidose láctica e acidentes vasculares cerebrais

**MERRF** – Epilepsia Mioclónica com Fibras Rotas e Vermelhas  
**MILS** – Síndrome de Leigh de transmissão materna  
**min** – minutos  
**mM** – milimolar  
**MMA** – Acidúria Metilmalónica  
**mRNA** – RNA mensageiro  
**mtDNA** – DNA mitocondrial  
**NADH** – Forma reduzida do dinucleótido de adenina e  $\alpha$  – nicotinamida  
**NARP** – Neuropatia, Ataxia e Retinite Pigmentosa  
**nDNA** – DNA nuclear  
**NDP** – nucleótido difosfato  
**NDPK** – cinase difosfato nucleosídeo  
**ND1 a 6** – NADH desidrogenase subunidade 1 a 6  
**OXPHOS** – Fosforilação Oxidativa  
**PEO** – Oftalmoplegia Externa Progressiva  
**PCR** – Reacção em Cadeia da Polimerase  
**Primers** – Cadeias oligonucleotídicas de iniciação  
**qtRT-PCR** – PCR quantitativo em tempo real  
**R** – Primer *Reverse*  
**RFLP** – polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição  
**RNA** – Ácido ribonucleotídico  
**RNR** – Redutase Ribonucleotídica  
**ROS** – Espécies Reactivas de Oxigénio  
**rpm** – rotações por minuto  
**RRFs** – Fibras rotas e vermelhas  
**s** – segundos  
**SCS-A** – subunidade  $\beta$  da enzima Succinil-CoA sintetase  
**SCS-G** – subunidade  $\alpha$  da enzima Succinil-CoA sintetase  
**SNC** – Sistema Nervoso Central  
**SSC** – Tampão *saline-sodium citrate*  
**rRNA** – RNA ribossómico  
**TAE** – Tampão tris-acetato-EDTA

**TCA** – Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

**TK2** – *Thymidine kinase*

**tRNA** – RNA de transferência

**V** – volt





# **CAPÍTULO I**

---

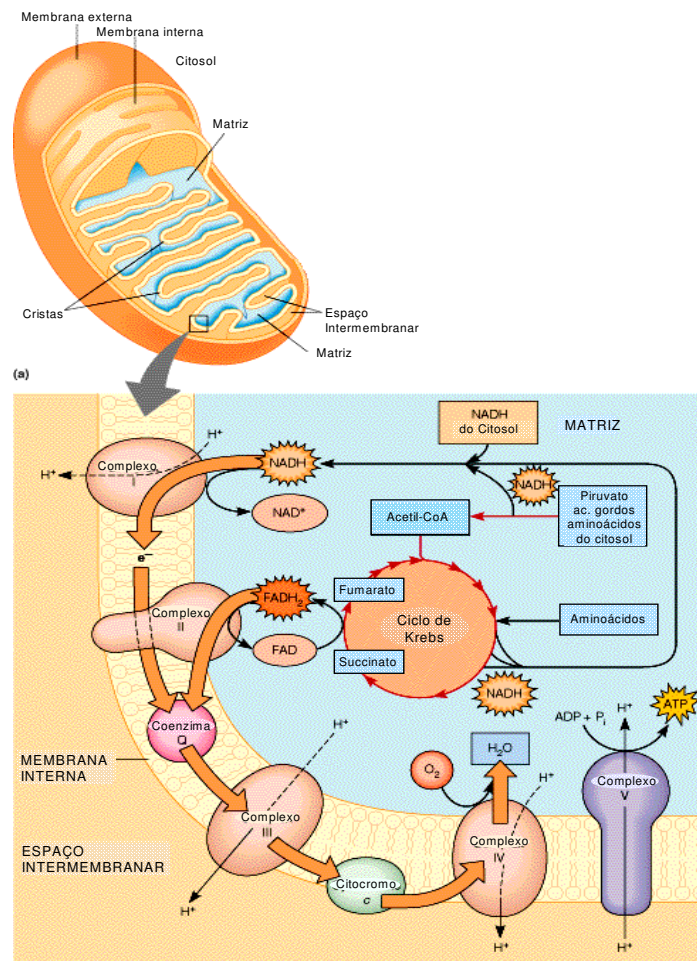
## **Introdução**



## 1. Mitocôndria

As mitocôndrias são organelos presentes em todas as células eucarióticas, tendo como função principal transformar a energia química dos substratos orgânicos em energia facilmente acessível à célula. São organelos esféricos ou alongados, medindo entre 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de largura e até 10  $\mu\text{m}$  de comprimento. A sua distribuição na célula é variável, mas tende a acumular-se no citoplasma onde o gasto de energia é mais intenso.

Ao microscópio electrónico, as mitocôndrias apresentam uma estrutura característica. São constituídas por duas membranas, a externa e a interna (fracção insolúvel), matriz e espaço intermembranar (fracção solúvel).



**Figura 1.** Representação esquemática da mitocôndria, e da localização das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) e outras vias metabólicas importantes (adaptado de <http://www.awl.com/mathews/ch01/frames.htm>).

A membrana externa é lisa e permeável a pequenas moléculas e iões. Possui inúmeras enzimas importantes para o metabolismo energético da célula, receptores e outros componentes chave do sistema de transporte transmembranar das proteínas. A membrana interna é constituída por grande quantidade de proteínas e fosfolípidos assim como transportadores específicos, ou translocases, responsáveis pelo transporte de metabolitos hidrófilos e ionizados da matriz para o exterior. Esta membrana apresenta cristas que aumentam consideravelmente a sua superfície e é o local onde se encontram as subunidades dos complexos multienzimáticos, transportadores de electrões móveis da cadeia respiratória mitocondrial (CRM), e da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Entre as cristas mitocondriais, existe uma matriz amorfa, rica em proteínas. A membrana interna e a matriz estão associadas à maioria das actividades funcionais da mitocôndria: ciclo de Krebs,  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos e síntese de ATP.

A mitocôndria está envolvida na homeostasia celular, tendo um importante papel na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteróides e nucleótidos. Contudo, a sua principal função é ao nível do metabolismo energético, isto é, na  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos, no ciclo da ureia e na via final comum de produção de ATP – cadeia respiratória.

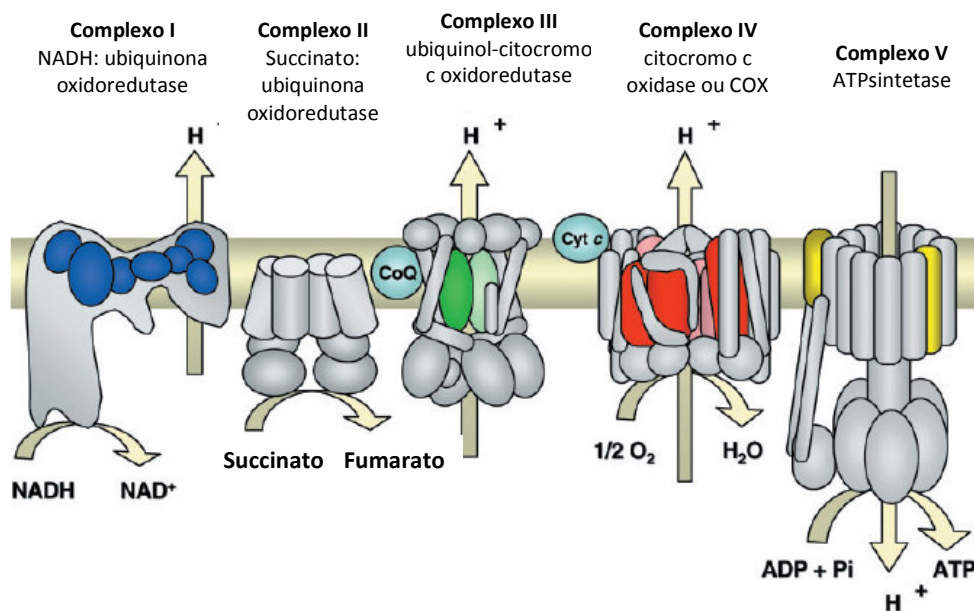
### **1.1 Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação Oxidativa**

Na mitocôndria ocorrem numerosos processos bioquímicos complexos que culminam com a produção de ATP. Indissociáveis desta função mitocondrial encontram-se a CRM e a Fosforilação Oxidativa (OXPHOS).

O sistema de fosforilação oxidativa é composto por 4 complexos enzimáticos constituintes da CRM (Complexo I - NADH: ubiquinona oxidoreductase; Complexo II - Succinato: ubiquinona oxidoreductase; Complexo III - ubiquinol-citocromo c oxidoreductase e Complexo IV - citocromo c oxidase ou COX) e pelo Complexo V (ATP sintetase) que usa a energia gerada pelo transporte de electrões, ao longo da cadeia respiratória, para formar o ATP. Cada complexo é composto por subunidades envolvidas no transporte de electrões através da membrana, e no

conjunto são responsáveis pela fosforilação oxidativa mitocondrial. A CRM possui ainda moléculas transportadoras de electrões, a ubiquinona e o citocromo c (Figura 2).

A estrutura membranar da mitocôndria permite fixar os componentes da CRM segundo uma ordem sequencial que facilita a transferência de electrões entre eles e determina uma alta velocidade e eficiência do sistema. Todos os componentes estão de tal forma interligados que o transporte de electrões se realiza com elevada especificidade, evitando-se reacções laterais. Os complexos I e II recebem electrões provenientes das diferentes desidrogenases e transferem-nos para um composto quinóide (CoQ). De seguida, os electrões são enviados para os complexos III e IV e finalmente reagem com o aceitador final, o oxigénio.



**Figura 2.** Complexos enzimáticos da CRM.  
(adaptado de Zeviani *et al.*, 2004 [1]).

Enquanto os electrões se movem através desta cadeia de transporte electrónico, os prótons são bombeados através da membrana interna mitocondrial ao nível dos complexos I, III e IV produzindo um gradiente. O complexo V utiliza a energia potencial armazenada no gradiente de prótons para condensar o ADP e o fosfato inorgânico em ATP, formando-se três moléculas de ATP por cada NADH oxidado e duas por cada  $FADH_2$  [2].

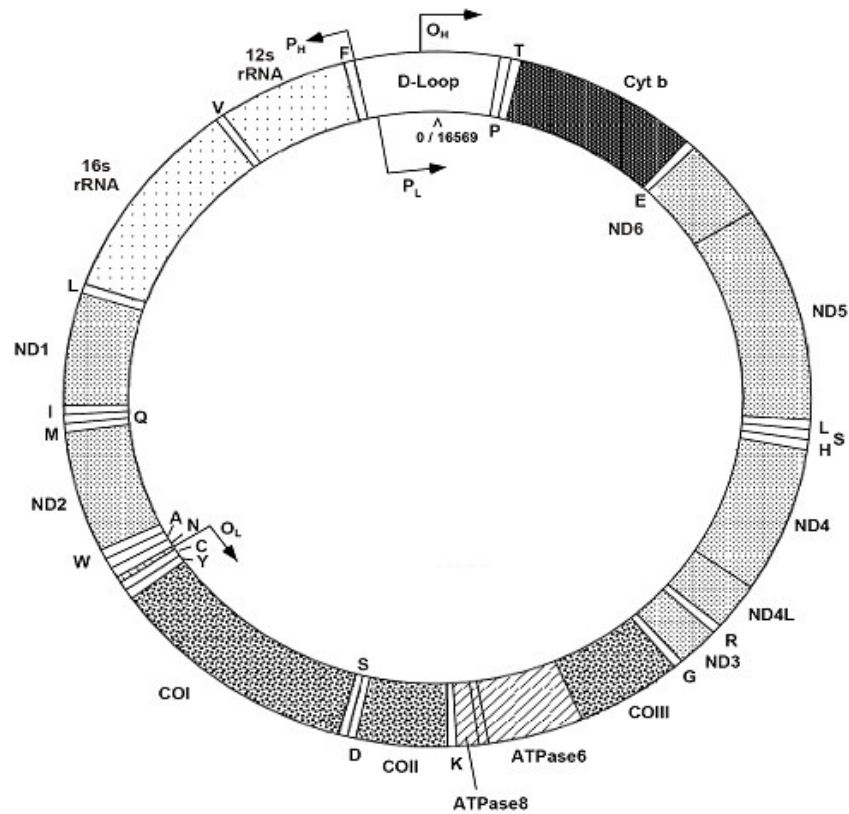
## 1.2 Genoma Mitocondrial

### 1.2.1 Organização

A formação da cadeia respiratória está sob o controlo de dois sistemas genéticos distintos, o genoma nuclear e o genoma mitocondrial.

O genoma mitocondrial (mtDNA) humano é uma longa molécula circular, constituída por DNA de cadeia dupla, com cerca de 16.569 pb (Figura 3). As duas cadeias possuem densidades diferentes, determinadas pelo seu conteúdo G+T, sendo descritas como cadeia pesada (*H-strand*), rica em purinas, e cadeia leve (*L-strand*), rica em pirimidinas. O mtDNA humano contém 37 genes que codificam 2 RNAs ribossómicos (rRNAs) – 12S e 16S, 22 RNAs de transferência (tRNAs – designados por letras maiúsculas correspondentes ao aminoácido que transferem) e 13 RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam 13 polipéptidos componentes da CRM-OXPHOS: 7 subunidades do complexo I (ND1-6, ND4L); 1 subunidade do complexo III (citocromo *b*); 3 subunidades do complexo IV (COX I, COX II e COX III) e 2 subunidades do complexo V (ATPase 6 e 8) [3]. Todas as subunidades do complexo II são codificadas pelo DNA nuclear (nDNA).

O mtDNA não possui intrões, todas as sequências codificantes são contíguas, no entanto existem duas zonas não codificantes, uma região com aproximadamente 1Kb que contém a origem de replicação da cadeia pesada – *D-loop* – e uma região com 30 nucleótidos que serve como origem de replicação da cadeia leve. Os genes dos tRNAs estão intercalados entre os genes dos mRNAs e os dos rRNAs, e desempenham um papel importante na correcta transcrição dos 13 mRNAs. Os tRNAs e os rRNAs codificados pelo mtDNA são utilizados exclusivamente na síntese de proteínas mitocondriais [4].

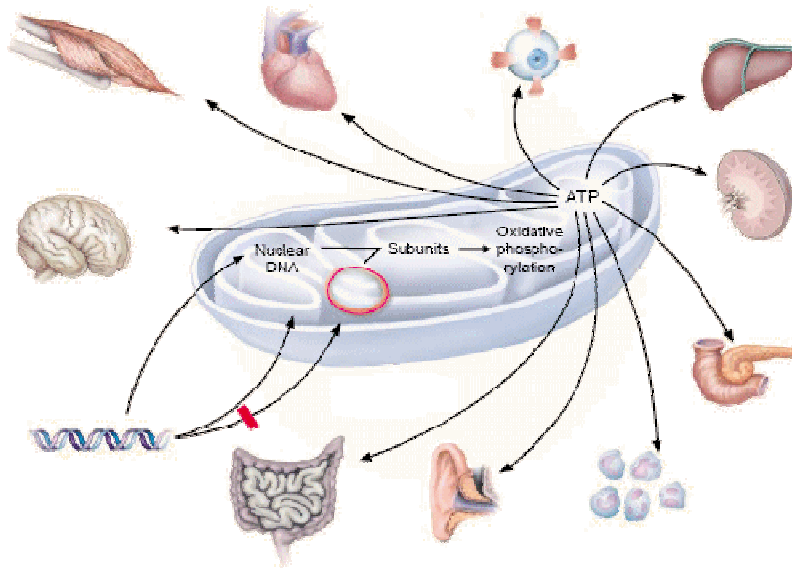


**Figura 3.** Representação do genoma mitocondrial humano (adaptado de <http://www.mitomap.org/mitomagenome.pdf>).

## 2. Citopatias mitocondriais

As citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças de expressão clínica heterogênea que têm na sua origem alterações do metabolismo energético celular. As disfunções mitocondriais hereditárias podem ser resultantes quer de mutações do nDNA quer do mtDNA. Assim podem ter qualquer tipo de hereditariedade, seja ela autossômica dominante, recessiva, ligada ao X ou ainda materna, ocorrendo também casos esporádicos. Estas

doenças, tipicamente, envolvem o SNC, o músculo-esquelético ou ambos. Outros órgãos, como o coração, pâncreas, olhos e rins podem também ser afectados, levando a um complexo espectro de manifestações clínicas. Possui uma incidência de 1 em cada 10000 nados-vivos [5].



**Figura 4.** Heterogeneidade dos órgãos afectados por citopatias mitocondriais [6].

O aparecimento dos primeiros sintomas pode ocorrer em qualquer idade, podendo estes ser fatais, progressivamente lentos ou rápidos ou até mesmo regredir com a idade. Actualmente não existe um tratamento geral com sucesso para este tipo de doenças, contudo já foram descritos alguns efeitos benéficos de terapêutica em alguns doentes [7].

A marca histológica das miopatias mitocondriais são as RRFs (*red ragged fibers*) demonstradas com coloração de Tricrómio de Gomori. A alteração das fibras musculares em RRFs é devida à acumulação de mitocôndrias anormais em número e tamanho sob o sarcolema. Apesar da importância do diagnóstico de RRFs ser indiscutível, é agora claro que a ausência de RRFs não põe de parte o diagnóstico de alteração mitocondrial. Várias colorações histoquímicas específicas para enzimas oxidativas são usadas para analisar a distribuição das mitocôndrias em fibras individuais e avaliar as actividades enzimáticas. A



coloração histoquímica ajuda no prognóstico da gravidade e na detecção de heterogeneidade da deficiência enzimática numa dada secção do músculo [8].

São também efectuados estudos bioquímicos que permitem identificar defeitos a nível da CRM. Contudo, tornou-se evidente que estes não são suficientes para classificar este grupo de doenças tão heterogéneo. Actualmente recorre-se a técnicas de biologia molecular, nomeadamente, ao PCR-RFLP e sequenciação automática para detecção de mutações, quer no genoma mitocondrial quer no genoma nuclear, bem como ao *Southern Blot* para detecção de rearranjos do mtDNA (deleções simples ou múltiplas e depleção), para efectuar um diagnóstico definitivo dos doentes suspeitos de citopatia mitocondrial [9].

## **2.1 Patologias associadas a alterações no mtDNA e/ou nDNA**

### **2.1.1 Mutações pontuais no mtDNA**

A alta taxa de mutação no mtDNA foi atribuída à falta de histonas protectoras, sistema de reparação deficitário e geração de radicais livres de oxigénio provenientes da cadeia respiratória. Assim, mais de 200 mutações patogénicas foram identificadas no mtDNA ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Estas podem estar associadas à ocorrência de doenças de transmissão materna, como por exemplo a atrofia óptica hereditária de Leber (LHON), a epilepsia mioclónica com fibras rotas e vermelhas (MERRF), a encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e acidentes vasculares cerebrais (MELAS), a oftalmoplegia externa progressiva (PEO) de transmissão materna, neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa (NARP) o Síndrome de Leigh de transmissão materna (MILS) e a diabetes e surdez (DAD), entre outras patologias.

### **2.1.2 Mutações nos genes nucleares**

Ao contrário dos casos referidos, grande parte das citopatias mitocondriais é causada por mutações nos genes nucleares que codificam para as subunidades dos complexos da cadeia respiratória, bem como para factores de processamento. Concomitantemente, 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 [10]. Esta situação está de acordo com o facto de apenas uma diminuta percentagem das proteínas funcionais na mitocôndria ser codificada pelo seu genoma. Noventa e cinco por cento das proteínas mitocondriais são codificadas por genes nucleares, produzidas como precursores nos polisomas citoplasmáticos, importadas para a mitocôndria e aí processadas e agrupadas nos compartimentos mitocondriais adequados.

Como exemplos de doenças causadas por mutações nestes genes pode-se referir o síndrome de Leigh, cardiomiopatia hipertrófica e encefalomiopatia, macrocefalia, leucodistrofia e epilepsia mioclónica, síndrome de De Toni-Fanconi-Debre e acidose metabólica, tubulopatia, encefalopatia e disfunção hepática.

### **2.1.3 Rearranjos de grandes dimensões**

Existem ainda doenças associadas a alterações espontâneas de maior dimensão do mtDNA (delecções e duplicações), que constituem um grupo de doenças com diversos sintomas clínicos. Por ordem de severidade, as delecções simples do mtDNA dão origem às miopatias mitocondriais que incluem a oftalmoplegia externa progressiva crónica (CPEO) [11, 12], o Síndrome de Kearns-Sayre esporádico (KSS) [13] e o Síndrome de Pearson [14]. Os sintomas mais severos no Síndrome de Pearson e no KSS podem ser explicados pelo facto das moléculas mutantes de mtDNA serem encontradas em diferentes quantidades em diversos tecidos, enquanto que na CPEO estão confinadas apenas ao músculo. A proporção de moléculas de mtDNA deletadas pode variar ao longo do tempo e entre diferentes tecidos.

#### **2.1.4 Mutações somáticas no mtDNA**

A “teoria da idade mitocondrial” sugere que as alterações no mtDNA se acumulam ao longo do tempo e resultam em defeitos na OXPHOS. Estes defeitos levam a um aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), por sua vez originando mais mutações no mtDNA, seguidas de defeitos ainda mais pronunciados na OXPHOS e no aumento de ROS [15]. Este ciclo vicioso resulta por último na perda da função nos diversos tecidos, por apoptose e insuficiência energética. Alguns estudos têm descrito várias mutações somáticas no mtDNA e deleções acumuladas ao longo do tempo [16], associadas a neurodegeneração [17] e cancro [18] em numerosos tecidos. No entanto, subsistem ainda algumas dúvidas sobre o significado destas mutações, uma vez que a maioria delas não atingem um nível alto de heteroplasmia.

#### **2.1.5 Depleção mitocondrial**

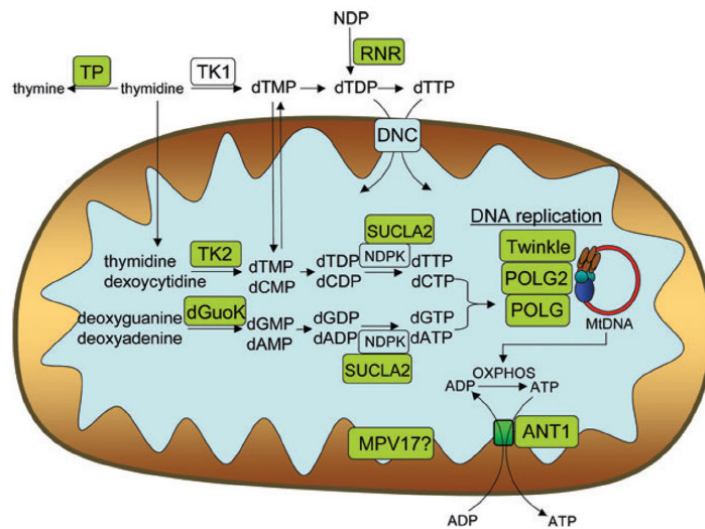
Os genomas nuclear e mitocondrial funcionam coordenadamente, aparentemente sob o controlo do genoma nuclear. A replicação, transcrição e tradução do genoma mitocondrial dependem de proteínas codificadas pelo nDNA. Assim, mutações em qualquer um dos genes que codificam para estas proteínas, podem supostamente afectar a integridade do mtDNA, quer qualitativa quer quantitativamente. Este tipo de mutações não é transmitido maternalmente, sendo segregadas de forma mendeliana.

O Síndrome de Depleção Mitocondrial (MDS) é um grupo clinicamente heterogéneo de doenças mitocondriais caracterizado por uma redução do número de cópias de mtDNA nos tecidos afectados, sem mutações ou rearranjos no mtDNA [10]. A depleção do mtDNA é assim, uma alteração a nível quantitativo [19], sendo transmitida de um modo autossómico recessivo. Pensa-se que qualquer deficiência durante o processo de replicação possa influenciar o número de cópias de mtDNA, sendo por isso uma doença com origem nuclear [20]. A actividade reduzida da CRM e, mais importante, a baixa razão de mtDNA/nDNA nos tecidos afectados, confirma o diagnóstico clínico do MDS.

### 2.1.5.1 Mecanismo patogénico

A síntese de mtDNA não é regulada pelo ciclo celular, e um fornecimento constante de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) é crucial para a manutenção da integridade mitocondrial. Tanto o excesso, como a deficiência de um ou mais dNTPs, pode causar um erro na síntese de DNA ou a supressão completa da mesma. Todos os dNTPs celulares podem ser sintetizados *de novo*. Esta via consiste em sucessivas reacções entre os nucleotídeos difosfato (NDPs) com a reductase rinonucleotídica (RNR) e as cinases dNDP produzindo os dNTPs. A actividade da RNR é elevada durante a fase S, quando o DNA nuclear é replicado, em contraste com a replicação do mtDNA que é contínua e replica-se mesmo depois da fase S [21,22]. Uma vez que não há aparentemente síntese *de novo* de nucleotídeos na mitocondria, e a membrana mitocondrial interna é impermeável a moléculas carregadas, o *pool* de nucleotídeos mitocondriais é mantido tanto pelo importe de dNTPs do citoplasma através de transportadores específicos, como pelos deoxiribonucleotídeos de reserva dentro da mitocôndria. Em células não replicativas (como os neurónios e as células musculares), onde a síntese de dNTPs citoplasmáticos é menor e o importe de nucleótidos do citoplasma para a mitocondria não é possível, a síntese de mtDNA depende unicamente da via de reserva. Nesta via de reserva, as cinases deoxiribonucleotídicas assumem um papel crucial. Duas delas, a cinase deoxiguanosina (DGUOK) e a cinase timidina (TK2), são expressas na mitocôndria humana (Figura 5). A DGUOK fosforila a deoxiguanosina e a deoxiadenosina, enquanto a TK2 fosforila a deoxitimidina, deoxicitidina e deoxiuridina. A via de reserva, depende assim da acção destas duas enzimas, que juntas permitem a síntese dos 4 nucleotídeos necessários à replicação e síntese do mtDNA [23,24].

A associação do MDS com mutações nos genes *DGUOK* (ENST00000264093) e *TK2* (ENST00000299697), sugere que a manutenção do *pool* de dNTPS mitocondrial assume um papel crucial na replicação e integridade do mtDNA e consequentemente no conteúdo de mtDNA.



**Figura 5.** Via de síntese de deoxirribonucleotídeos (dNTP) no citosol e na mitocôndria. A verde encontram-se os genes associados ao MDS ou a mutações no mtDNA. (adaptado de Copeland, 2008 [24]).

Outros genes foram também associados, directamente ou indirectamente ao MDS, nomeadamente o *ANT1* (*Official Symbol*: SLC25A4; ENST00000281456), *POLG1* (ENST00000268124) e *2* (ENSACAT0000001089), *C10orf2* (*Twinkle*) (ENST00000311916) *SUCLA2* (ENST00000378654), *SUCLG1* (ENST00000393868), *MPV17* (ENST00000405983) e *RRM2B* (ENST00000251810). A proteína **ANT1** forma uma estrutura homodimérica, presente na membrana mitocondrial interna, que troca ATP por ADP para dentro e para fora da matriz mitocondrial, regulando assim a concentração de nucleotídeos de adenina tanto no compartimento mitocondrial como no citoplasmático, mediando também os sinais de consumo de energia para a cadeia respiratória. A relação entre as mutações no *ANT1* e os defeitos no mtDNA ainda não são claras. Todavia existem duas hipóteses alternativas para a patogénese. A primeira está relacionada com um desequilíbrio entre o ATP e ADP, principalmente numa situação de stress quando as necessidades são maiores [26]. Este desequilíbrio poderá afectar os “depósitos” mitocondriais de nucleotídeos (dNTP), uma vez que pode não haver ADP suficiente para produzir dATP ou para fornecer ATP para a fosforilação dos dNTPs. Um desequilíbrio na quantidade de dNTPs pode afectar a eficiência ou fidelidade replicativa do

mtDNA, bem como a síntese de *primers* de RNA necessários para o início da replicação. Alternativamente, devido ao ANT1 fazer parte do *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) e ligar-se a factores anti- e pró-apoptóticos, mutações nesta proteína podem desencadear a apoptose ou aumentar a produção de ROS, que por sua vez são mutagénicos, causando rearranjos no mtDNA. Quando estas moléculas de mtDNA mutadas mais pequenas são geradas replicam-se mais rapidamente do que as moléculas de mtDNA normal [27].

O gene ***POLG1***, codifica a subunidade catalítica da polimerase  $\gamma$  enquanto o gene ***POLG2*** codifica a subunidade acessória (DNA Pol $\gamma$ ) do mtDNA [28]. A DNA Pol $\gamma$  desempenha um importante papel na replicação e reparação do mtDNA. Dependendo do domínio afectado pela mutação são esperados diferentes efeitos funcionais. Mutações no domínio polimerase poderão afectar, preferencialmente, a actividade catalítica e a capacidade de processamento da enzima [29], enquanto que mutações no domínio exonuclease afectarão a fidelidade da replicação do mtDNA, promovendo a acumulação de mutações ou rearranjos no mesmo [30]. A diminuição da capacidade de processamento pode determinar a interrupção prematura da replicação e geração de cadeias líder nascentes incompletas.

O gene ***C10orf2*** (também denominado ***Twinkle***) codifica uma helicase mitocondrial [31]. As DNA helicases medeiam a replicação, reparação, recombinação e transcrição do DNA. A proteína codificada por este gene é uma helicase 5'-3' de DNA dependente da adenina, pensando-se que deve precisar de outros factores para uma actividade completa. É essencial para a manutenção e síntese do mtDNA e provavelmente é também reguladora do número de cópias do mtDNA [32].

O gene ***SUCLA2*** codifica a subunidade  $\beta$  da enzima succinil-CoA sintetase (SCS-A). Apesar de ser provável não estar directamente envolvido no metabolismo do DNA, mutações neste gene, podem levar a depleção do mtDNA [33]. Um defeito no último passo da via de reserva dos dNTPs mitocondriais pode estar associado à patogénese das mutações no gene ***SUCLA2***.

A SCS-A tal como a SCS-G (subunidade  $\alpha$  da enzima succinil-CoA sintetase codificada pelo gene ***SUCLG1***) estão intrinsecamente associadas com a cinase

difosfato nucleosídeo (NDPK), que contribui também para a homeostasia dos ribonucleotídeos e deoxiribonucleotídeos na mitocôndria [34].

Outro gene envolvido é o **MPV17** que codifica uma pequena proteína da membrana mitocondrial interna de função ainda pouco esclarecida. Pensa-se que participa na manutenção do *pool* de dNTPs necessário para a síntese de mtDNA [35]. O seu papel na patogênese do MDS é ainda desconhecido, mas estudos no ortólogo de levedura, *SYM1*, sugerem para esta proteína, um papel na resposta celular ao stress metabólico [36]. A disponibilidade de ratinhos *knock-out MPV17*, fornece uma ferramenta importante para elucidar a função deste gene na homeostasia mitocondrial e investigar a sua patogênese nas doenças, principalmente no MDS [34].

O **RRM2B** é o gene que codifica a subunidade R2 da reductase ribonucleotídica (RNR), uma enzima citosólica que está envolvida no passo terminal da síntese *de novo* dos deoxiribonucleotídeos, convertendo os nucleotídeos em deoxiribonucleotídeos durante a fase S do ciclo celular [37] bem como no suplemento de dNTPs durante a reparação do DNA [38].

#### **2.1.5.2 Genética Clínica e Molecular**

O MDS é um grupo heterogêneo de doenças, bastante comum na idade infantil. São conhecidas três formas clínicas de MDS: miopática, hepatocerebral e encefalomiopática [19, 39, 40, 41, 42].

##### **2.1.5.2.1 Forma miopática**

O aparecimento de sintomas, ocorre normalmente no primeiro ano de vida, com dificuldade alimentar, atraso de crescimento, hipotonia e fraqueza muscular. A creatina cinase (CK) está frequentemente aumentada sendo este um sinal importante para o diagnóstico, uma vez que não é muito comum em pacientes com outras miopatias mitocondriais. A morte ocorre normalmente nos primeiros anos de vida devido a insuficiência pulmonar e infecções, mas existem casos de alguns pacientes estudados que sobreviveram até à adolescência [19, 39]. Estas manifestações clínicas e bioquímicas são acompanhadas de sinais

morfológicos típicos de miopatia mitocondrial tal como a presença de fibras citocromo c oxidase negativas. A proliferação de mitocôndrias sob a forma de RRF, não é uma característica primária consistente, no entanto, as RRFs podem aparecer mais tarde no decurso da doença. Defeitos bioquímicos em todos os complexos da CRM codificados pelo mtDNA estão sempre presentes nas mitocôndrias do tecido muscular.

As mutações no gene *TK2*, estão especificamente associadas à forma miopática. Em 2001, Saada e colaboradores [43], identificaram duas mutações no gene *TK2*, a p.H90N e a p.I181N em 4 crianças com uma forma severa miopática de MDS. A actividade específica da TK2 era reduzida em 13-32% nas mitocôndrias do tecido muscular destes doentes, comparados com controlos. Depois desta primeira observação, um total de 11 mutações no *TK2* já foram descritas em 12 pacientes. A prevalência de mutações neste gene na forma miopática é de aproximadamente 20% [44].

#### **2.1.5.2.2 Forma Hepatocerebral**

Esta é provavelmente a variante mais comum de MDS. O aparecimento ocorre também na infância (entre o nascimento e os 6 meses de vida) e os sintomas iniciais incluem vómitos persistentes, atraso no crescimento, hipotonia e hipoglicemia [45]. As alterações histológicas na biópsia hepática, incluem esteatose lipídica, proliferação dos ductos biliares, fibrose e colapso da arquitectura hepática. As mitocôndrias do fígado, mostram normalmente, uma deficiência combinada dos complexos da CRM codificados pelo mtDNA [46]. A morte ocorre normalmente dentro do primeiro ano de vida. Uma forma peculiar de MDS hepatocerebral é o síndrome Alpers-Huttenlocher, de aparecimento precoce e fatal, caracterizado por falência hepática, convulsões, evoluindo para epilepsia parcial contínua e deterioração neurológica global [47]. A disfunção hepática é normalmente progressiva e evolui de esteatose microvesicular com proliferação dos ductos biliares para cirrose e falência hepática crónica. O uso de ácido valpróico como terapia para a epilepsia pode precipitar a falência hepática aguda [48].



O MDS hepatocerebral tem vindo a ser associado a mutações nos genes *DGUOK*, *POLG1* e *MPV17*.

#### **2.1.5.2.3 Forma Encefalomiopática**

Em 2005, Elpeleg e colaboradores [48], descreveram uma forma de encefalomiopatia autossómica recessiva associada a depleção de mtDNA numa família Árabe. A descendência tinha um atraso psicomotor grave com hipotonia muscular proeminente, problemas de audição e convulsões generalizadas. A ressonância magnética cerebral foi sugestiva de síndrome de Leigh com lesões nos gânglios basais. Um primo afectado apresentava hipotonia muscular, perda de movimentos voluntários, perda auditiva bilateral, convulsões generalizadas e atraso psicomotor grave. Ambos os pacientes mostraram um decréscimo significativo da actividade dos complexos I e IV no músculo esquelético, enquanto a actividade dos complexos III e V estava menos comprometida. O mesmo tecido, mostrou uma profunda depleção de mtDNA com uma razão mtDNA/nDNA de 32% do valor normal. Os testes renais e hepáticos em ambos foram normais. Nestes dois pacientes, foi identificada uma mutação homozigótica no gene *SUCLA2* que codifica a subunidade  $\beta$  succinil-CoA sintetase formadora de ADP (SCS-A), responsável pelos referidos sintomas clínicos.

Em estudos anteriores [49], foram reportados casos de acidúria metilmalónica (MMA) moderada, uma doença hereditária do metabolismo, associada também a depleção de mtDNA. A succinil-CoA sintetase catalisa a síntese reversível do succinato e ATP a partir de succinil-CoA e ADP no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Esta reacção que representa o passo final da via do ácido metilmalónico levou alguns investigadores [50] a estudar o gene *SUCLA2* numa série de doentes, com MMA moderada ou não esclarecida, com sintomas clínicos semelhantes com os doentes descritos por Elpeleg e colaboradores, 2005 [48]. Neste estudo [50], foram detectadas três mutações patogénicas no gene *SUCLA2*.



## **CAPÍTULO II**

---

### **Objetivos**



Os principais objectivos definidos para a realização deste trabalho de investigação consistiram em:

- 1) Implementar o estudo da depleção mitocondrial no laboratório, por *Southern Blot* e PCR quantitativo em tempo real, de modo a disponibilizar este tipo de diagnóstico a nível nacional.
- 2) Identificar os defeitos quantitativos no mtDNA sob a forma de depleção em 14 doentes, através dos resultados obtidos pelas duas técnicas implementadas.
- 3) Identificar defeitos qualitativos, sob a forma de mutações nos genes *DGUOK* e *TK2*, nos doentes com depleção mitocondrial.



## **CAPÍTULO III**

---

### **Pacientes e Métodos**





## 1. Pacientes

A amostra analisada neste estudo é constituída por 14 doentes portugueses com diagnóstico clínico sugestivo de depleção mitocondrial.

**Tabela 1.** Dados clínicos e/ou bioquímicos dos 14 pacientes deste estudo.

Paciente	Sexo	Idade de diagnóstico	Alterações clínicas e/ou bioquímicas
1†	M	29 Dias	Acidose grave Colestase Falência hepática / multiorgânica Paragem cardio-respiratória
2†	F	1 Mês	Coagulopatia Hepatopatia Anemia
3	M	2 Meses 18 dias	Hepatopatia com fibrose hepática Ascite Hipertrofia Ventricular Cardíaca Síndrome <i>minor</i> malformativo Desnutrição grave Colestase neonatal Cardiomiopatia hipertrofica Atrofia muscular
4	M	1 Ano	Citólise hepática sustentada Diabetes insulino-dependente História familiar relevante (consanguinidade, alterações hepáticas e irmão com quadro semelhante)
5†	F	5 Anos	Mioclonias Convulsões com hemiparesia esquerda Hipotonia Dificuldade em caminhar e manter o equilíbrio Atraso do desenvolvimento Acidose metabólica Falência hepática Movimentos oculares involuntários
6	M	15 Dias	n/d
7	M	29 Dias	Colestase não esclarecida Mioclonias
8†	M	1 Ano	Défice múltiplo da CRM
9	M	1 Mês	Doença multissistémica Hepatite

10	M	1 Ano	Colestase nos primeiros meses de etiologia não esclarecida Alterações na imagiologia cerebral Macrocefalia Alterações cardíacas e pulmonares (estenose da válvula pulmonar)
11	F	15 Meses	n/d
12	F	10 Anos	n/d
13	F	1 Ano	Obesidade Movimentos oculares erráticos Hipotonia muscular Movimentos espontâneos anormais Braquicefalia e plagiocefalia Atraso neuropsicomotor severo Convulsões mioclónicas Défice múltiplo da CRM
14	M	2,5 Anos	Hepatomegalia Lípidos e triglicéridos aumentados Hipoglicemia Função hepática alterada Esteatose e fibrose hepática

† Falecido

n/d – não disponível

## 2. Métodos

### 2.1 Extracção de DNA

A extracção de DNA foi feita a partir de sangue total por extracção automática e a partir de biópsia muscular e/ou hepática, através de um *kit* comercial da QIAGEN (Cat. No. 158622). A determinação da concentração (ng/μL) e da pureza do DNA total foi obtida por quantificação no aparelho NanoDrop® ND-1000 *UV-Vis Spectrophotometer*.

#### 2.1.1 Extracção automática de DNA de sangue total

O DNA foi obtido por extracção automática no aparelho Bio Robot EZ1 (QIAGEN), utilizando o *kit* EZ1 DNA Blood 350 μL (QIAGEN), específico para a extracção de DNA a partir de sangue total. Na utilização deste *kit* foi seguido o protocolo indicado pelo fabricante.

### 2.1.2 Extracção de DNA de biópsia muscular e/ou hepática (Puregene® Core kit A - QIAGEN)

O isolamento de DNA a partir de biópsia muscular e/ou hepática é efectuado mediante a lise celular pela proteinase K a 55 °C, até a solução se tornar homogénea. Segue-se um tratamento com RNase e precipitação de proteínas. O DNA é seguidamente, precipitado pelo isopropanol, seguido de lavagem com etanol a 70 %. Posteriormente é dissolvido e hidratado em soluções fornecidas pelo *kit*.

### 2.2 Southern Blot

Neste trabalho experimental, o *Southern blot*, foi utilizado com os seguintes objectivos:

- 1) pesquisar a presença de deleções simples ou múltiplas do mtDNA através do uso de uma única sonda para mtDNA;
- 2) pesquisar a presença de depleção do mtDNA através da utilização de duas sondas: uma para mtDNA e outra para nDNA.

**Tabela 2.** Localização e sequência dos *primers* das sondas de mtDNA e nDNA.

Sonda	Localização	Primers
mtDNA	8273 a 13720 da molécula de mtDNA	F – CCCCTCTACCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC
		R – GGCTCCGGCTGCCAGGCCTTAATGGG
nDNA	3657 a 5523 do gene <i>rRNA 18S</i> humano	F – TACCTGGTTGATCCTGCCAGT
		R – GATCCTCCGCAGGTTCACTAC

Abreviaturas: F – refere-se à sequência nucleotídica da cadeia orientada de 5' → 3' e R – à sequência nucleotídica da cadeia complementar.

As amostras de DNA de tecidos, com concentração entre 100-200 ng/ $\mu$ L, foram testadas num gel de agarose 1% (*Invitrogen*), com *SYBR Green* (*Roche*), juntamente com um marcador de pesos moleculares ( $\lambda$ /Hind III). A electroforese foi processada a 100 V durante 15 min. Conforme a intensidade das bandas obtidas no passo anterior, foi digerida uma determinada quantidade de DNA que variou entre 3  $\mu$ L para bandas mais intensas, e 10  $\mu$ L para as menos intensas. Este passo tem como objectivo linearizar a molécula circular do mtDNA. Para esse efeito, foi utilizada a endonuclease de restrição *PvuII*, que possui um único local de corte na posição nt-2652. A digestão foi processada a 37 °C, durante 1 hora. Seguidamente, todas as amostras digeridas foram testadas num gel de agarose a 1% com *SYBR Green* (100V durante 15 min), de forma a verificar se a digestão ocorreu nas melhores condições. O restante volume digerido foi submetido a uma electroforese (30V, *overnight*) em gel de agarose a 1% com brometo de etídio<sup>1</sup>, paralelamente com o marcador de pesos moleculares  $\lambda$ /Hind III. Este passo permite a separação dos fragmentos de DNA digeridos. Posteriormente os fragmentos de DNA no gel são desnaturados com uma solução de desnaturação (Anexo II-a), e neutralizados com um tampão de neutralização (Anexo II-a), tendo sido realizados ambos os passos à temperatura ambiente, sob agitação durante 30 min. Uma vez separados e desnaturados, os fragmentos de DNA são transferidos para uma membrana de *nylon* (*Zeta-Probe<sup>R</sup> GT Genomic Tested Blotting MemBranes – BioRad*) através de um sistema baseado na transferência hidrodinâmica (capilaridade), com o tampão SSC 10x (Anexo II-a). Este movimento do tampão permite a transferência mecânica do DNA presente no gel para a membrana. A transferência foi processada durante a noite. No dia seguinte, a membrana é removida do gel e seca à temperatura ambiente.

Na hibridização foi utilizado o método de marcação com fluorescência, através do *kit* de Hibridização e Detecção – *Amersham Gene Images<sup>TM</sup> AlkPhos Direct<sup>TM</sup> Labelling and Detection System* (GE Healthcare). Este *kit* está preparado para marcação directa do ácido nucleico (sonda) com fosfatase alcalina

---

<sup>1</sup> Neste passo é usado como corante, o brometo de etídio, uma vez que o *SYBR Green* é fotossensível, tendo menor durabilidade.

conjugada com detecção quimioluminescente com um determinado reagente – *CDP Star* (GE Healthcare). O sistema – *Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection* é baseado na quimioluminescência de dioxetano, que envolve a marcação directa da sonda de DNA, com uma enzima termostável especialmente desenvolvida, a fosfatase alcalina. A adição de um *cross-linker* permite a ligação da enzima de marcação ao ácido nucleico, na forma de cadeia simples (Anexo II-b). Uma vez marcada, a sonda é usada para a hibridização com o DNA alvo imobilizado na membrana. O tampão de hibridização, incluído no *kit*, assegura a eficiência da hibridização, protegendo a enzima contra a inactivação durante este passo, o que confere maior sensibilidade ao sistema. A membrana foi pré-hibridizada (tampão de pré-hibridização, sem sonda – Anexo II-a) a 55 °C aproximadamente 20 min. Seguidamente, adicionou-se a sonda previamente desnaturada e a hibridização foi realizada durante a noite, a 55 °C em forno rotativo.

Após a hibridização, a membrana foi submetida a algumas lavagens para a remoção do excesso de sonda com os tampões de lavagem 1 e 2 (Anexo II-a). O que confere rigor a este passo é a variação da temperatura durante os passos de lavagem, 2x10 min a 55 °C e 2x5 min à temperatura ambiente, em forno rotativo, para os tampões de lavagem 1 e 2, respectivamente.

Seguidamente, a membrana foi impregnada (5 min à temperatura ambiente) com *CDP-Star™*, reagente para detecção quimioluminescente, que utiliza a fosfatase alcalina ligada à sonda para catalisar a decomposição do substrato dioxetano. Isto permite uma rápida emissão de luz, que atinge o seu máximo em 4 horas, prolongando-se por vários dias, possibilitando múltiplas/longas exposições. Por fim, a membrana foi exposta a um filme fotográfico numa cassete (*Hypercassette™ Amersham LIFE SCIENCE*) durante aproximadamente 2 horas. A revelação foi feita num aparelho Fujifilm FPM-100A.

Para o estudo da depleção mitocondrial, a mesma membrana foi novamente re-hibridada com a sonda nuclear, seguindo o mesmo procedimento a partir do passo da hibridização. Na película deverão ser identificadas as amostras analisadas, entre as quais deverão estar os controlos negativos e

positivo, bem como o *uncut*<sup>2</sup>, para validação dos resultados. O tamanho e intensidade das bandas (fragmentos de DNA) são avaliados através do marcador de pesos moleculares e por densitometria, respectivamente. Para este efeito, foi utilizado o sistema de imagem *Gel Doc XR - BioRad*, através do programa *Quantity One 4.6.6*.

### 2.3 qtRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real)

Esta técnica, tal como o *Southern blot*, foi usada com o objectivo de detectar a depleção do mtDNA.

O PCR quantitativo em tempo real, é uma técnica altamente sensível que permite amplificação e quantificação de uma sequência de DNA específica através da detecção do produto de PCR em tempo real. A quantificação de DNA, cDNA ou RNA pode facilmente ser obtida através da determinação do ciclo onde ocorre a primeira detecção do produto de PCR, em contraste com a detecção final do PCR convencional, que não permite uma quantificação precisa dos ácidos nucleicos. Os produtos de PCR podem ser detectados usando corantes fluorescentes que se ligam a DNA de cadeia dupla ou através de sondas específicas para determinada sequência de DNA marcadas com fluorescência. Neste trabalho, foi usado o corante fluorescente Eva Green® que se liga a todas as moléculas de DNA de cadeia dupla, emitindo um sinal fluorescente de um comprimento de onda definido, quando se dá a ligação. A detecção ocorre no passo de extensão do PCR em tempo real. A intensidade do sinal aumenta com o aumento do número de ciclos devido à acumulação do produto de PCR. O uso de corantes fluorescentes permite a análise de diferentes moléculas sem ter que sintetizar sondas específicas. No entanto, produtos de PCR não específicos e dímeros de *primer* podem também contribuir para o sinal de fluorescência. Deste modo, é necessária uma elevada especificidade no PCR quando se usa Eva Green®. A fluorescência gerada pelo Eva Green® é indicativa da quantidade de produto de PCR na reacção, indicando se a reacção está na fase exponencial e se

---

<sup>2</sup> O *uncut* é uma amostra de DNA que não é sujeita ao processo de digestão, servindo como controlo negativo relativamente às amostras digeridas.

a amplificação procede com eficiências semelhantes para todas as amostras. Seleccionando o *threshold*<sup>3</sup> dentro da fase exponencial para todas as amostras é possível calcular a quantidade real de DNA no momento inicial, uma vez que a intensidade de fluorescência é directamente proporcional à quantidade de produto de PCR nesta fase. Neste estudo, o *threshold* usado para análise das amostras foi ajustado em 0.05, de modo a analisar os resultados de cada amostra, nas mesmas condições. Os dois métodos mais comuns para analisar resultados de PCR em tempo real são a quantificação absoluta e a quantificação relativa. A quantificação absoluta determina a quantidade absoluta da amostra expressa em número de cópias ou concentração, normalmente relacionando com um sinal de PCR de uma curva *standard*. Alternativamente, pode ser feita uma quantificação relativa, que determina a razão entre a quantidade da nossa amostra em estudo (neste caso o mtDNA através do gene *MT-ND1*) e de uma molécula de referência endógena, normalmente um gene *housekeeping* que está presente em todas as amostras (neste caso o *rRNA 18S*). Essa razão vai ser depois comparada entre diferentes amostras de referência, neste caso, controlos negativos para depleção do mtDNA. Os genes *MT-ND1* e o *rRNA 18S* (gene de referência endógena) são amplificados para todas as amostras. O valor normalizado é determinado para cada amostra e é usado para comparar a quantidade de mtDNA em relação ao nDNA.

Assim, para a quantificação do mtDNA e nDNA por qRT-PCR, foram efectuadas duas curvas de calibração (em triplicado), utilizando diluições seriadas de DNA extraído de biópsia muscular. Foi seleccionado o gene mitocondrial *MT-ND1* e o gene nuclear *rRNA 18S*, para determinar a razão entre o número de cópias do mtDNA e do nDNA. Foram estudados quatro controlos negativos para depleção do mtDNA e os doentes 1 e 9, cujo DNA foi extraído a partir de biópsia muscular.

---

<sup>3</sup> É o valor que deve ser ajustado acima do *background* (refere-se à fluorescência não específica na reacção) e significativamente abaixo do *plateau* da fase de amplificação. Deve ser colocado dentro da região linear da curva de amplificação, que representa a faixa logaritmica-linear detectável do PCR.

A reacção de PCR em tempo real foi efectuada em triplicado para cada amostra e foram também efectuadas pelo menos três experiências independentes para cada uma delas e para os dois genes em estudo. Esta reacção contém 1,25 µl de 1x GoTaq®Flexi DNA Polymerase (*Promega*), 1,5 µl de cada primer – *forward* e *reverse* (5 pmol/µL) (Tabela III.3 ), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM (*Promega*), 2 µl de dNTP's 2 mM (*Fermentas*), 1,25 µl do fluorocromo EvaGreen® 20x (*Biotium*), 2,5 ng de DNA (amostra ou calibrador) e água desionizada de forma a perfazer um volume final de 25 µl. As condições do PCR em tempo real são 2 minutos a 50°C e 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C e 60 segundos de *annealing*/extensão a 60°C. No final do processo de amplificação, as curvas de *melting* são analisadas entre 60-95°C (temperatura de transição de 0,1°C/s), como controlo da fluorescência contínua para controlar a ausência de produtos inespecíficos. A intensidade de sinal fluorescente é analisada num aparelho de PCR quantitativo em tempo real (*Rotor-Gene 6000 - Corbett, Life Sciences*).

**Tabela 3.** *Primers* e condições utilizadas na reacção de qtRT-PCR.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Condições de qtRT-PCR
<b>MT-ND1</b>	F – ccctaaaacccgccacatct	50 °C – 2' 95 °C – 10' 95 °C – 15'' 60 °C – 60'' 95 °C – 15'' 72 °C – 10' 60-95 °C – 0,1°C/s
	R – gagcgatggtgagagctaaggt	
<b>rRNA 18S</b>	F – ggcgcccccaacttctta	
	R – gggcatcacagacctgtattg	

#### 2.4 Análise mutacional dos genes *DGUOK* e *TK2*

Foi efectuada a análise mutacional dos genes *DGUOK* e *TK2* para identificação das mutações causais da depleção. Todos os estudos de análise directa do DNA foram efectuados em produtos de PCR. Os *primers* utilizados



foram desenhados com o auxílio do programa *Primer3*<sup>4</sup> e testados, a nível de várias características, entre as quais dimerização, qualidade e temperatura de *annealing*, com o programa *FastPCR*<sup>5</sup>. Para os genes *DGUOK* e *TK2*, foram desenhados 7 e 10 pares de *primers*, respectivamente, abrangendo a totalidade dos exões e regiões intrónicas flanqueadoras. A estes *primers*, foi ainda adicionada uma “cauda” M13F e M13R (fragmento a sombreado na Tabela 4) para facilitar a realização do *PCR* de sequenciação, já que permite a utilização de um *primer* universal para todos os fragmentos. Para todas as reacções de amplificação foi utilizada a mistura comercial *ImmoMix Red 1X - Biotin* (contendo DNA polimerase IMMOLASE™, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Tween 20, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs e tampão Tris-HCl) e *primers* (*Forward* e *Reverse*) a uma concentração de 50 pmol/μL. A utilização desta mistura de amplificação apresentou diversas vantagens, na medida em que diminui consideravelmente o número de manipulações efectuadas, bem como o risco de contaminação. Na mistura de reacção utilizaram-se aproximadamente 60 ng de DNA para um volume final de 12,5 μL. As condições necessárias para esta amplificação, bem como os *primers* utilizados, encontram-se resumidas na Tabela 4.

#### **2.4.1 Análise da reacção de PCR e purificação dos produtos amplificados**

O sucesso da amplificação dos diversos exões foi verificado através da separação dos fragmentos correspondentes por electroforese num gel de agarose a 2 % com *SYBR Green (Roche)* em tampão TAE 1x (Anexo III) a 125V durante 15 min.

---

<sup>4</sup> <http://www.primer3.com>

<sup>5</sup> <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>

**Tabela 4.** Sequência dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos genes *DGUOK* e *TK2* e suas condições de PCR.

Gene	Exão	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho do produto amplificado	Condições de PCR *10 min; **5 min
<i>DGUOK</i>	1	F – atacctagggcgaagtgtct R – agctccttcccagcctctgtc	269 pb	95°C 61°C 72°C 1' 1' 1'
	2	F – ctgagttggcgctttgtg R – aactggctactttactcactg	302 pb	
	3	F – aaactgtttggggaggt R – gatcaaacaggcagcactga	346 pb	
	4	F – ctctgtcctttcattccat R – gctctctgtgctgcaggtaa	336 pb	
	5	F – ccgaagactgcattgtagca R – gacattccaaccatttcag	310 pb	
	6	F – tggcgagtatgtgaaactt R – ccataggccttggagtgtga	311 pb	
	7	F – ctcatggccttggctgcatat R – gctcttgagcggcagagt	349 pb	
<i>TK2</i>	1	F – ccaagttatgggtgcgttc R – cgggagtaggtgggcgcat	409 pb	95°C 61°C 72°C 1' 1' 1'
	2	F – ttttagccaggagtgagcat R – ttcttctccctggagatcct	282 pb	
	3	F – gccctttccgtagcattat R – tttctccgttctctcaaac	194 pb	
	4	F – tcactttcccctcaactta R – accatattctcaggtgc	196 pb	
	5	F – tgtcctcagtccttgtga R – aagttcccttctctgcaa	251 pb	
	6	F – acatttctcaaggcctcctg R – ctccatctgtcaatcgaata	234 pb	
	7 ***	F – tcaagatcctttgggggaat R – gaactccaagggaagt	283 pb	
	8	F – ctgtgtcctgctttgctt R – aggtggttcccagttgtc	194 pb	
	9	F – ctctgcttgacacccttgg R – ccctcccctgtctcaag	242 pb	
	10	F – ctccagctgtgaaaggaggat R – aaaatcaagctggccagaca	285 pb	

Abreviaturas: F – refere-se à sequência nucleotídica da cadeia orientada de 5' → 3' e R – à sequência nucleotídica da cadeia complementar; \* desnaturação inicial (95 °C); \*\* extensão final (72 °C); \*\*\* Temperatura de *annealing*: 65 °C; Nº de ciclos de PCR: 30; pb – pares de bases.

A sequência da cauda F é **TGTA AACGACGGCCAGT** e da cauda R é **CAGGAAACAGCTATGACC**.

Após visualização dos fragmentos amplificados, utilizando um transiluminador de luz ultra-violeta, os produtos de PCR foram purificados através da enzima ExoSap (*usb*<sup>®</sup>) (30 min a 37°C seguido de 15 min a 80°C).

#### 2.4.2 Sequenciação dos genes *DGUOK* e *TK2*

A preparação da amostra para sequenciação automática, iniciou-se pela reacção de sequenciação (PCR assimétrico). Para tal, utiliza-se uma mistura comercial *BigDye*<sup>®</sup> *Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (*AB-Applied Biosystems*) que contém dNTPS, ddNTPS marcados com 4 fluorocromos distintos, tampão e uma DNA polimerase, à qual se adiciona o produto de PCR previamente purificado e um dos *primers* (Tabela 5).

**Tabela 5.** Mistura de reacção utilizada no PCR de sequenciação.

	Volume	Concentração
<i>Big Dye</i>	2,0 µL	-
<i>Primer Forward / M13F</i> ou <i>Primer Back / M13B</i>	0,5 µL	3,2 pmol/µL
DNA purificado	2,5 µL	-

A reacção de PCR assimétrico foi efectuada utilizando as condições indicadas na Tabela 6. Os fragmentos sintetizados, foram purificados utilizando colunas preenchidas com Sephadex G-50 (*Amersham Biosciences*). Após centrifugação a 4400 rpm durante 4 min, adicionou-se ao produto purificado HI-Di Formamida Desionizada (*Applied Biosystems*), que é uma substância desnaturante e de elevada viscosidade.

**Tabela 6.** Condições do PCR de sequenciação.

Temperatura	Tempo	Ciclos
94 °C	2 min	1
94 °C	10 seg	25
50 °C	6 seg	
60 °C	4 min	

A sequenciação automática foi realizada num ABI PRISM™ 3130XL Genetic Analyser de 16 capilares de 36 cm (*Applied Biosystems*). Este tipo de sequenciação baseia-se no método desenvolvido por *Sanger et al* (1977) e recorre a nucleótidos terminadores da cadeia que são didesoxiribonucleótidos trifosfatados marcados com um fluorocromo na extremidade 3' (ddNTP). O sequenciador detecta a fluorescência dos 4 didesoxiribonucleotídeos, distinguindo os diferentes comprimentos de onda de luz emitida por radiação da amostra. Na análise das sequências obtidas foram utilizadas como referências as sequências dos genes *DGUOK* (ENST00000264093) e *TK2* (ENST00000299697) disponíveis na base de dados *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>).

## **CAPÍTULO IV**

---

### **Resultados e Discussão**



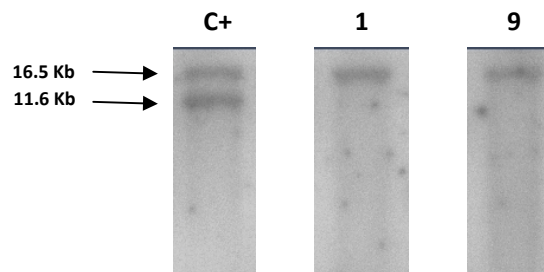
## 1. Southern blot

Esta técnica foi usada com o objectivo de identificar defeitos quantitativos/qualitativos no mtDNA. Numa primeira parte, o DNA, uma vez imobilizado na membrana foi hibridizado com uma sonda de mtDNA que é especificamente desenhada de modo a ligar-se a uma zona da molécula de mtDNA altamente conservada, com pouca probabilidade de alteração. Este passo teve como objectivo verificar a presença de defeitos qualitativos, deleções simples ou múltiplas, na molécula de mtDNA. Por último, a mesma membrana foi novamente hibridizada com uma sonda para nDNA, que consiste numa sequência homóloga a um gene *housekeeping*, o rRNA 18S. Deste modo, é possível verificar a presença de defeitos quantitativos, depleção do mtDNA, através da razão mtDNA/nDNA.

Expressando-se o MDS preferencialmente nos tecidos muscular e hepático, foram apenas estudados por esta técnica, os doentes 1 e 9, cujo DNA total foi extraído de biópsia muscular, não se tendo conseguido obter DNA destes tecidos para os restantes pacientes estudados.

### 1.1 Deleções simples ou múltiplas

Não foi detectada positividade para deleções simples ou múltiplas do mtDNA nos doentes estudados (Figura 6).



**Figura 6.** Southern blot dos doentes 1 e 9 para pesquisa de deleções simples e múltiplas.

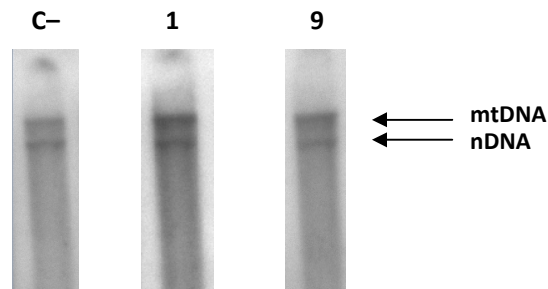
C+ : Controlo positivo para deleção simples de 4977pb.

Como é visível através da Figura 6, os doentes 1 e 9 possuem a molécula de mtDNA completa, por comparação com um controlo positivo para deleção simples. Este controlo, possui a banda correspondente à molécula de mtDNA completa e outra banda, correspondente a moléculas de mtDNA com uma deleção simples, e por isso, com menor peso molecular.

### 1.2 Depleção do mtDNA

Para verificar a presença de depleção mitocondrial nos doentes estudados, a razão mtDNA/nDNA para todas as amostras foi obtida por densitometria.

É possível verificar através da Figura 7 e do cálculo da razão mtDNA/nDNA por densitometria (Tabela 7), a ausência de depleção mitocondrial nos doentes estudados. O conteúdo em mtDNA é aproximadamente 100 % para ambos os doentes, tal como para o controlo negativo. Num doente com depleção do mtDNA devia ser visível uma banda de mtDNA muito ténue relativamente ao gene *housekeeping*, uma vez que as suas moléculas de mtDNA estariam presentes em menor quantidade.



**Figura 7.** Southern blot dos doentes 1 e 9 para pesquisa de depleção do mtDNA. C-: Controlo negativo para depleção mitocondrial. Nota: A imagem para cada doente corresponde a experiências independentes.



**Tabela 7.** Conteúdo de mtDNA, expresso em percentagem, obtido pela técnica de *Southern blot*.

	Densidade (intensidade/mm <sup>2</sup> )			Conteúdo mtDNA
	mtDNA	nDNA	mtDNA/nDNA	
C-	139836	133378	1,048	
1	109661	107487	1,020	~ 100 %
9	122537	117644	1,041	

## 2. qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real)

### 2.1 Determinação da eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação dos dois genes (*MT-ND1* e *rRNA 18S*) foi comparada através da preparação de uma série de diluições para cada um deles, a partir de um DNA controlo. Cada uma das séries de diluições foi seguidamente amplificada por PCR em tempo real e o valor de  $C_T^6$  obtido é utilizado para construir uma curva *standard* para os dois genes. É sempre necessária uma curva *standard* para cada gene, uma vez que as eficiências de amplificação dos genes são normalmente diferentes. Isto pode ser devido à eficiência de *annealing* dos *primers*, conteúdo em GC da sequência a amplificar e tamanho do produto de PCR.

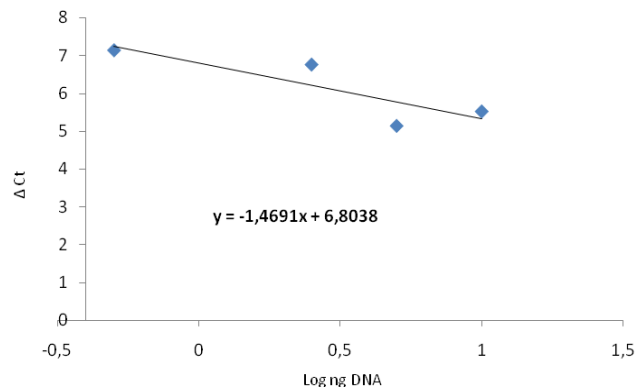
A eficiência de amplificação (E) para cada gene é fornecida directamente pelo programa *Rotor Gene 6000 Series software 1.7*, podendo também ser calculada através da seguinte equação:

$$E = 10^{(-1/S)} - 1, \text{ onde } S \text{ é o declive da curva } \textit{standard}$$

---

<sup>6</sup> Ciclo *Threshold* ( $C_T$ ): é o ciclo de PCR no qual é detectado um aumento de fluorescência significativo. O  $C_T$  serve como uma ferramenta para calcular a quantidade de DNA inicial em cada amostra.

Para comparar as eficiências de amplificação de duas amostras, o valor de  $C_T$  para o gene *MT-ND1* é subtraído ao valor de  $C_T$  do gene *rRNA 18s*. A diferença nos valores de  $C_T$  é depois traçada em função do logaritmo da quantidade de amostra. Se o declive da linha resultante for  $<0.1$ , as eficiências de amplificação são semelhantes. (Os valores usados para o cálculo da eficiência foram obtidos através da média dos triplicados feitos para cada reacção e para cada gene.)



**Figura 8.** Comparação da eficiência de amplificação do qtRT-PCR para o gene de interesse (*MT-ND1*) e para o gene de referência (*rRNA 18s*). A diferença das eficiências foi determinada através do declive da linha de tendência.

Sendo o declive da recta  $-1,4691$  e por isso, inferior a  $0,1$ , podemos afirmar que as eficiências de amplificação de PCR dos dois genes são semelhantes. Assim, podemos aplicar o método comparativo ou  $\Delta\Delta C_T$  para a quantificação das amostras de DNA a estudar.

## 2.2 Método comparativo ou método $\Delta\Delta C_T$ para quantificação relativa

Este método, baseia-se na comparação directa dos valores de  $C_T$  e pressupõe que as eficiências de amplificação de ambos os genes sejam semelhantes. Uma vez que os valores da concentração dos controlos negativos foram pouco semelhantes, este método foi também escolhido para a análise de resultados deste trabalho, uma vez que faz a normalização dos valores dos controlos, de modo a obter resultados com maior fidelidade e exactidão.

A preparação das curvas *standard* é necessária para determinar as eficiências de amplificação do gene de interesse e do gene de referência no início da experiência e para nos dar o valor da concentração das amostras a analisar, por interpolação dos valores individuais de  $C_T$  na equação da recta. Se as eficiências de amplificação forem comparáveis, a quantidade de DNA vai ser simplesmente calculada usando os valores de  $C_T$ , conforme se descreve a seguir.

Primeiro, foi determinado o valor de  $\Delta C_T$  para cada amostra calculando a diferença do valor de  $C_T$  para o nosso gene de interesse e para o gene de referência. Isto é determinado para cada amostra de referência (controles negativos para depleção mitocondrial) e para cada doente.

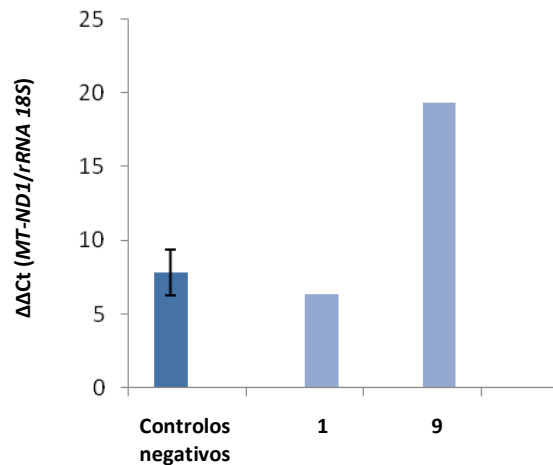
$$\Delta C_T (\text{doente}) = C_T \text{ MT-ND1} - C_T \text{ rRNA 18S}$$

$$\Delta C_T (\text{amostra de referência}) = C_T \text{ MT-ND1} - C_T \text{ rRNA 18S}$$

De seguida, é determinado o valor  $\Delta\Delta C_T$  subtraindo o valor  $\Delta C_T$  (amostra de referência) ao  $\Delta C_T$  (doente).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{doente}) - \Delta C_T (\text{amostra de referência})$$

Se as eficiências de PCR do gene de interesse e do gene de referência forem comparáveis, o valor normalizado do nível de expressão do gene de interesse é calculado usando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  [51]. É o caso dos resultados apresentados na Figura 9 e Tabela 8 onde se podem ver os valores da razão mtDNA/nDNA para os doentes estudados baseados no método  $\Delta\Delta C_T$ .



**Figura 9.** Nº de cópias relativo do mtDNA dos doentes em relação ao valor médio dos controlos.

**Tabela 8.** Conteúdo de mtDNA, expresso em percentagem, obtido pela técnica de qRT-PCR.

	$\Delta\Delta C_t$ (MT-ND1/rRNA 18S)	Conteúdo mtDNA
<b>C-</b>	7,838031	100 %
<b>1</b>	6,35205	81,4 %
<b>9</b>	19,35991	247%

**Nota:** a percentagem do conteúdo em mtDNA para o limite superior e inferior do desvio padrão é de **119,6%** e **81,2%**, respectivamente.

Através do PCR quantitativo em tempo real foi possível verificar que o doente 1 apresenta uma reduzida quantidade de mtDNA depletado (cerca de 19 %) encontrando-se próximo do limite inferior do desvio padrão para os controlos negativos. Relativamente ao doente 9, é visível a ausência de depleção mitocondrial, no entanto, é bastante evidente um aumento do conteúdo de mtDNA, denotando a presença de proliferação mitocondrial.

### 2.3 Vantagens do PCR quantitativo em tempo real, relativamente ao *Southern blot*

Através deste estudo e da optimização destas técnicas, foi possível verificar que o PCR quantitativo em tempo real, possui algumas vantagens relativamente ao *Southern blot*, nomeadamente:

- Rapidez – O qtRT-PCR é uma técnica na qual é possível obter os resultados ao fim de poucas horas, em contraste com o *Southern blot*, em que a análise de resultados é apenas possível ao fim de 5 dias, sendo por isso uma técnica mais morosa.
- Menor probabilidade de contaminação laboratorial – Uma vez que o *Southern blot* possui vários passos ao longo de 5 dias, é maior a probabilidade de introdução de erros e/ou contaminações, ao longo da sua execução, aumentando a variabilidade e diminuindo a sua sensibilidade. No qtRT-PCR, essa probabilidade é bastante reduzida, devido principalmente à diminuição dos procedimentos a executar e à ausência de manipulação das amostras pós-PCR.
- Sensibilidade e especificidade – No qtRT-PCR é necessária uma maior exigência na optimização de todas as condições nomeadamente, qualidade e concentração do DNA a estudar, desenho de *primers* e condições de PCR (por exemplo: temperaturas de *annealing*, quantidade e concentração dos reagentes a usar).

No *Southern blot* são necessárias grandes quantidades de biópsia de tecidos (concentrações de DNA entre 100-200 ng/ $\mu$ L, em contraste com os 2,5 ng/ $\mu$ L usados no qtRT-PCR neste trabalho). Por outro lado, este método é mais susceptível a artefactos, provenientes por exemplo, da saturação da membrana na hibridização de DNA, da transferência de DNA incompleta, do *background* de hibridização que pode levar a determinações incorrectas, da saturação do sinal, entre outros. Deste modo, o *Southern blot*, é uma técnica menos sensível e portanto, menos apropriada para um rápido e preciso diagnóstico pré e pós-natal ou para estudos de ligação familiar.

### 3. Análise mutacional dos genes *DGUOK* e *TK2*

Neste estudo efectuou-se a verificação da integridade molecular dos genes *DGUOK* e *TK2*, em 14 doentes com fenótipo clínico sugestivo de depleção mitocondrial. Foi detectada a presença de uma mutação patogénica (p.H226R), em heterozigotia, no gene *DGUOK* (Tabela 9) já descrita na literatura. Foram também identificados alguns polimorfismos (dois não descritos na literatura), em ambos os genes estudados, a maioria em heterozigotia (Tabela 9 e 10).

**Tabela 9.** Alterações encontradas neste estudo, no gene *DGUOK*.

<i>DGUOK</i>			
Alteração ao nível do cDNA	Alteração peptídica	Doente	Referência
c. 4 G>T	p. A2S	5, 10	[52]
c. 677 A>G	p. H226R	1	[53]
IVS7+13 A>T	-	1, 9, 12,13,14*	Não descrita

\* alteração presente no estado homozigótico.

**Tabela 10.** Alterações encontradas neste estudo, no gene *TK2*.

<i>TK2</i>			
Alteração ao nível do cDNA	Alteração peptídica	Doente	Referência
c. 89 A>G	p. K30R	1, 8, 9, 10, 12	[54]
c. 97 C>G	p. P33A	9, 12	[54]
IVS9-13 G > A	-	1	Não descrita

A mutação p.H226R no gene *DGUOK*, presente no doente 1, envolve a troca de uma histidina por uma arginina num local altamente conservado. Foi descrita como uma mutação patogénica por Dimmock e colaboradores [53]. Uma vez que o MDS possui um modo de transmissão autossómica recessiva, é necessária a manifestação simultânea de dois alelos mutados. Em nenhum dos doentes analisados foi encontrada positividade para nenhuma mutação patogénica adicional, através da técnica utilizada. Contudo, mais estudos poderão ser realizados no sentido de verificar a possibilidade da presença de uma deleção de grande tamanho, em heterozigotia, que em conjunto com a mutação patogénica p.H226R, poderá ser responsável pelo fenótipo clínico deste

doente. A presença de uma única mutação patogénica em heterozigotia e uma razão mtDNA/nDNA por qtRT-PCR próxima do limite inferior do normal, sugere que serão necessários mais estudos para verificar com maior exactidão, a presença de MDS neste doente. Estes estudos, passariam por analisar o transcripto do gene *DGUOK*, sob a forma de mRNA, de modo a poder identificar uma possível deleção de grande tamanho (por exemplo, de um ou mais exões) que não é possível identificar por sequenciação automática do DNA genómico (gDNA), como foi realizado neste estudo. No caso de não ser detectada nenhuma alteração patogénica adicional, este doente poderá apenas ser portador da mutação patogénica encontrada neste estudo.

A troca de uma alanina por uma serina no codão 2 (p.A2S) do gene *DGUOK* foi identificada nos doentes 5 e 10. Esta alteração foi descrita por Camaret e colaboradores [52], onde consideram que esta troca de uma alanina por uma serina afecta a parte N-terminal da sequência sinal e portanto, não terá nenhum efeito significativo no importe de proteínas para a mitocôndria (*ExpASY proteomics tool Mitoprot*; <http://www.expasy.org/tools>). Esta pode portanto, ser considerada uma alteração não patogénica, ou seja, um polimorfismo.

A alteração p.K30R presente nos doentes 1, 8, 9, 10 e 12 e a p.P33A presente nos doentes 9 e 12, do gene *TK2*, podem ser considerados polimorfismos. Possuem uma frequência de 35,7% e 14,2%, respectivamente, na amostra estudada. Apesar da dimensão da amostra usada neste trabalho ser muito pequena para que estes resultados possam ter significado estatístico, na realidade eles vêm de encontro aos dados publicados na literatura. Foram descritos num estudo de Galbiati e colaboradores [54], no qual a frequência alélica destas substituições foi verificada em 345 indivíduos controlo saudáveis, representando 690 alelos. A alteração p.K30R em heterozigotia apresentava uma frequência de 10,3 % e no estado homozigótico 1%. A segunda alteração, p.P33A, apresentou uma frequência de 3,6 % em heterozigotia, sendo que nenhum indivíduo controlo a manifestou em homozigotia. Concluíram também que os indivíduos heterozigóticos para a alteração p.P33A parecem ser um sub-haplogrupo da alteração p.K30R, porque esta alteração está sempre presente nesse subgrupo de indivíduos controlo. Estes resultados, estão de acordo com o

obtido neste estudo, quer a nível de frequência, quer a nível de ocorrência, uma vez que a alteração p.P33A aparece sempre associada à p.K30R.

As alterações IVS7+13 A>T (*DGUOK*) e IVS9-13 G>A (*TK2*) ocorrem em heterozigotia em 5 e 1 dos doentes estudados, respectivamente. Uma vez que até à data não foram referenciados na literatura, foi usado o programa *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) para previsão de locais de *splicing* consoante a alteração introduzida. Foi observado que nenhuma destas duas alterações leva à criação de novos locais de *splicing* ou abolição dos já existentes (Anexo III, Figuras 10 e 11). Sendo assim, estas duas alterações não descritas na literatura, têm fortes probabilidades de não serem patogénicas. No entanto, mais estudos poderão ser realizados de modo a clarificar o papel destas novas alterações. Estes estudos passariam pela análise da sua presença/ausência em quantidades estatisticamente significativas de uma população controlo saudável, por técnicas de PCR-RFLP, bem como possíveis estudos funcionais.

No doente 9, não foi encontrada nenhuma mutação patogénica. Neste estudo, foi possível verificar a presença de um conteúdo aumentado de mtDNA em relação aos indivíduos controlo, denotando a existência de uma possível proliferação mitocondrial. Este resultado é mais evidente no qtRT-PCR do que no *Southern blot*, uma vez que esta é uma técnica menos sensível. Esta menor sensibilidade para a detecção da maior quantidade de mtDNA neste caso em específico pode ter sido devido, por exemplo, à saturação da membrana durante a transferência das amostras a partir do gel ou à saturação do sinal de fluorescência, entre outros. A razão maior de mtDNA/nDNA obtida no qtRT-PCR, é portanto atribuída a uma quantificação mais precisa de um grande número de cópias de mtDNA, por esta técnica. De modo a comprovar a proliferação mitocondrial neste doente, será relevante prosseguir com mais estudos, principalmente bioquímicos, como por exemplo, quantificar os níveis de citrato sintetase ou succinato desidrogenase, que fazem parte do ciclo de Krebs. A proliferação mitocondrial pode ser uma resposta celular à disfunção mitocondrial, nomeadamente a defeitos graves na actividade enzimática da CRM. A proliferação mitocondrial poderá ser o único padrão molecular em doenças mitocondriais de origem genética desconhecida [55, 56].



## **CAPÍTULO VI**

---

### **Conclusão e Perspectivas futuras**



O MDS constitui um grupo clinicamente heterogéneo de doenças mitocondriais com um largo espectro de sinais e sintomas, devidas ao anormal funcionamento metabólico da mitocôndria, atribuídos a alterações no nDNA que se reflectem na quantidade de mtDNA (expressa em número de cópias).

Este estudo permitiu:

- i) A implementação e optimização das técnicas de *Southern blot* e PCR quantitativo em tempo real para o estudo da depleção mitocondrial.
- ii) Concluir acerca da maior rapidez, sensibilidade, especificidade e precisão do qRT-PCR em relação ao *Southern blot*. Sendo assim, este método poderá permitir a realização de um melhor diagnóstico molecular pré e pós-natal relacionado com defeitos quantitativos do mtDNA, um melhor e mais adequado aconselhamento genético familiar e possibilitar o estabelecimento de uma correlação entre o genótipo e o fenótipo clínico. Esta correlação seria sobretudo útil na medida em que permitiria efectuar um prognóstico da evolução clínica em novos doentes em que sejam identificadas alterações quantitativas do mtDNA.
- iii) A identificação de uma mutação patogénica já descrita na literatura (p.H226R) no doente 1. A presença de depleção mitocondrial neste doente não ficou totalmente esclarecida e portanto mais estudos deverão ser realizados, de modo a detectar a presença de outra alteração patogénica responsável pelo seu fenótipo clínico, ou confirmar este indivíduo apenas como portador da mutação em causa.
- iv) Verificar a presença de um aumento considerável do conteúdo em mtDNA, traduzindo uma proliferação mitocondrial, no doente 9. A confirmação desta afirmação deverá ser feita futuramente mediante a aplicação de métodos bioquímicos, de modo a poderem ser correlacionados com esta alteração.
- v) A identificação de três polimorfismos descritos na literatura e dois não descritos, presentes nos genes *DGUOK* e *TK2*. Apesar do estudo bioinformático dos não descritos ter sugerido a ausência de patogenicidade, as suas consequências não são totalmente claras para a determinação do fenótipo clínico.

Será de todo o interesse e relevância prosseguir com a análise e estudo dos restantes genes associados ao MDS (*POLG1*, *C10orf2*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *MPV17* e *RRM2B*), para todos os doentes deste estudo. Deste modo, poderão ser identificadas as alterações patogénicas responsáveis pelos fenótipos clínicos associados.

Para os restantes doentes, e na possibilidade de obtenção de material proveniente de amostras de tecido (principalmente muscular e/ou hepático), será importante realizar o estudo da depleção do DNA mitocondrial por qtRT-PCR, de modo a poder verificar quantitativamente a sua presença/ausência. Sempre que possível, para um melhor esclarecimento da patologia em questão, será conveniente e vantajoso complementar estes resultados com a realização de mais exames clínicos e bioquímicos, permitindo proporcionar um diagnóstico mais correcto e preciso para além de um estudo molecular mais direccionado.

## **CAPÍTULO VII**

---

### **Bibliografía**



1. Zeviani M and Donato S (2004). Mitochondrial disorders. *Brain* 127: 2153-2172.
2. Cooper JM and Clark JB (1994) The structural organization of the mitochondrial respiratory chain. Mitochondrial disorders in neurology. Schapira AHV – DiMauro S. Butterworth-Heinemann Ltd – Oxford, pp: 1-30.
3. Zeviani M, Servidei S, Gellera C, Bertini E, DiMauro S and DiDonato S (1989) An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339: 309-311.
4. DiMauro S and Schon E (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England Journal of Medicine* 348: 2656-2568.
5. Graff C, Bui T and Larsson N (2002) Mitochondrial diseases. *Best Practice & Research Obstetrics and Gynaecology* 16: 715-728.
6. Johns D (1995) Mitochondrial DNA and disease. *The New England Journal of Medicine* 333: 638-644.
7. DiMauro S and Mancuso M (2007) Mitochondrial diseases: Therapeutic approaches. *Bioscience Reports* 27: 125-137.
8. Paepe B, Bleecker JL and Van Coster R (2009) Histochemical methods for the diagnosis of mitochondrial diseases. *Current Protocols in Human Genetics*, Unit 19.2.
9. Wong LC and Boles R (2005) Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Review. Clinica Chimica Acta.* 354:1-20.
10. Hirano M, Marti R, Ferreiro-Barros C, Vila MR, Tadesse S, Nishigaki Y, Nishino I and Vu TH (2001) Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 12: 417-427.
11. Holt IJ, Harding AE and Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331: 717-719.
12. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC and Servidei S (1989) Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *The New England Journal of Medicine* 320: 1293-1299.
13. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA and Rowland LP (1988) Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 51: 1525-1533.
14. Rotig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM and Munnich A (1989) Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* 1: 902-903.
15. Trounce I, Byrne E and Marsuki S (1989) Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet* 25: 637-639.

16. Cortopassi GA, Shibata D, Soong NM and Arnheim N (1992) A pattern accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA* 89: 7370-7374.
17. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH and Wallace DC (1994) Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics* 23: 471-476.
18. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW and Vogelstein B (1998) Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nature Genetics* 20: 291-293.
19. Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S (1991) mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *American Journal of Human Genetics* 48: 492-501.
20. Hirano M and Vu T (2000) Defects of intergenomic communication: Where do we stand? *Brain Pathology* 10: 451-461.
21. Bogenhagen D and Clayton DA (1977) Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11: 719-727.
22. Song S, Wheeler LJ and Mathews CK (2003) Deoxyribonucleotide pool imbalance stimulates deletions in HeLa cell mitochondrial DNA. *Journal of Biological Chemistry* 278: 43893-43896.
23. Johansson M, Bajalica-Lagercrantz S, Lagercrantz J and Karlsson A (1996) Localization of the human deoxyguanosine kinase gene (DGUOK) to chromosome 2p13. *Genomics* 38: 450-451.
24. Wang L, Munch-Petersen B, Herrstrom Sjoberg A, Hellman U, Bergman T, Jornvall H and Eriksson S (1999) Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Letters* 443: 170-174.
25. Copeland WC (2008) Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annual Review of Medicine* 59: 131-146.
26. Suomalainen A and Kaukonen J (2001) Diseases caused by nuclear genes Affecting mtDNA stability. *American Journal of Medical Genetics* 106: 53-61.
27. Moraes CT, Kenyon L and Hao H. (1999) Mechanisms of human mitochondrial DNA maintenance: The determining role of primary sequence and length over function. *Molecular Biology of the Cell* 10: 3345-3356.
28. Van Goethem G, Löfgren A, Dermaut B, Ceuterick C, Martin J, Broeckhoven (2003) Digenic progressive external Ophthalmoplegia in sporadic patient: Recessive mutations in POLG and C10orf2/Twinkle. *Human Mutation* 22: 175-176.
29. Longley M, Graziewicz M, Bienstock R and Copeland W (2004) Consequences of mutations in human polymerase  $\gamma$ . *Gene* 354: 125-131.



30. Del Bo R, Bordoni A, Sciacco M, Di Fonzo A, Galbiati S, Crimi M, Bresolin N and Comi GP (2003) Remarkable infidelity of polymerase  $\gamma$ A associated with mutations in POLG1 exonuclease domain. *Neurology* 61: 903-908.
31. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M and Larsson C (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genetics* 28: 223-231. *Erratum in: Nat Genet* 2001 29: 100.
32. Tyynismaa H, Sembongi H, Bokori-Brown M, Granycome C, Ashley N, Poulton J, Jalanko A, Spelbrink J, Holt I and Suomalainen A (2004) Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Human Molecular Genetics* 13: 3219-3227.
33. Elpeleg O, Miller C, Hershkovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi-Rubinstein G, Rahman S, Pagnamenta A, Eshhar S and Saada A (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *American Journal of Human Genetics* 76: 1081-1066.
34. Spinazzola A and Zeviani M (2007) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Bioscience Reports* 27: 39-51.
35. Wong LJ, Brunetti-Pierri N, Zhang Q, Yazigi N, Bove KE, Dahms BB, Puchowicz MA, Gonzalez-Gomez I, Schmitt ES, Truong CK, Hoppel CL, Chou PC, Wang J, Baldwin EE, Adams D, Leslie N, Boles RG, Kerr DS and Craigen WJ (2007) Mutations in the MPV17 gene are responsible for rapidly progressive liver failure in infancy. *Hepatology* 46: 1218-1227.
36. Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, DiMauro S, Rötig A, Gasparini P, Ferrero I, Mootha VK, Tiranti V and Zeviani M (2006) MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nature Genetics* 38: 570-575.
37. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y and Nakamura Y (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404: 42-49.
38. Nordlund P and Reichard P (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 75: 681-706.
39. Tritschler HJ, Andreetta F, Moraes CT, Bonilla E, Arnaudo E, Danon MJ, Glass S, Zelaya BM, Vamos E, Telerman-Toppet N, Shanske S, Kadenbach B, DiMauro S and Schon EA (1992) Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mitochondrial DNA. *Neurology* 42: 209-217.

40. Vu TH, Sciacco M, Tanji K, Nichter C, Bonilla E, Chatkupt S, Maertens P, Shanske S, Mendell J, Koenigsberger MR, Sharer L, Schon EA, DiMauro S and DeVivo DC (1998) Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion. *Neurology* 50: 1783–1790.
41. Ducluzeau PH, Lachaux A, Bouvier R, Streichenberger N, Stepien G and Mousson B (1999) Depletion of mitochondrial DNA associated with infantile cholestasis and progressive liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 30: 149–155.
42. Elpeleg O (2003) Inherited mitochondrial DNA depletion. *Pediatric Research* 54: 153–159.
43. Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S and Elpeleg O (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature Genetics* 29: 342–344.
44. Alberio S, Mineri S, Tiranti V, Zeviani M (2007) Depletion of mtDNA: Syndromes and genes (Review) *Mitochondrion* 7: 6-12.
45. Mazziotta MR, Ricci E, Bertini E, Vici CD, Servidei S, Burlina AB, Sabetta G, Bartuli A, Manfredi G, Silvestri G, Moraes CT and DiMauro S (1992) Fatal infantile liver failure associated with mitochondrial DNA depletion. *Journal of Pediatrics* 121: 896–901.
46. Slama A, Giurgea I, Debrey D, Bridoux D, de Lonlay P, Levy P, Chretien D, Brivet M, Legrand A, Rustin P, Munnich A and Rotig A (2005) Deoxyguanosine kinase mutations and combined deficiencies of the mitochondrial respiratory chain in patients with hepatic involvement. *Molecular Genetics and Metabolism* 86: 462–465.
47. Spinazzola A and Zeviani M (2007) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Bioscience Reports* 27: 39-51.
48. Elpeleg O, Miller C, HersHKovitz E, Bitner-Glindzicz M, Bondi- Rubinstein G, Rahman S, Pagnamenta A, Eshhar S and Saada A (2005) Deficiency of the ADP-forming succinyl-CoA synthase activity is associated with encephalomyopathy and mitochondrial DNA depletion. *American Journal of Human Genetics* 76: 1081–1086.
49. Yano S Li L, Le TP, Moseley K, Guedalia A, Lee J, Gonzalez I and Boles (2003) RG. Infantile mitochondrial DNA depletion syndrome associated with methylmalonic aciduria and 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase deficiencies in two unrelated patients: a new phenotype of mtDNA depletion syndrome. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* 26: 481-488.
50. Carrozzo R, Dionisi-Vici C, Steuerwald U, Lucioli S, Deodato F, Di Giandomenico S, Bertini E, Franke B, Kluijtmans L, Meschini MC, Rizzo C, Piemonte F, Rodenburg R, Santer R, Santorelli F, Rooij A, Vermunt-de Koning D, Morava E and Wevers AR (2007) *SUCLA2* mutations are associated with mild methylmalonic aciduria, Leigh-like encephalomyopathy, dystonia and deafness. *Brain* 130: 862-874.
51. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2—DDCt method. *Methods* 25: 402-408.

52. Camaret BM, Taanman J, Padet S, Chassagne M, Mayençon, Clerc-Renaud P, Mandon G, Zabet MT, Lachaux A and Bozon D (2007) Kinetic properties of mutant deoxyguanosine in a case of reversible hepatic mtDNA depletion. *Biochemical Journal* 402: 377-385.
53. Dimmock DP, Zhang Q, Dionisi-Vici C, Carrozzo R, Shieh J, Tang LY, Truong C, Schmitt E, Sifry-Platt M, Lucioi S, Santorelli FM, Ficocioglu CH, Rodriguez M, Wierenga K, Enns GM, Longo N, Lipson MH, Vallance H, Craigen WJ, Scaglia F and Wong LJ (2008) Clinical and molecular DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Human Mutation* 29: 330-331.
54. Galbiati S, Bordoni A, Papadimitriou D, Toscano A, Rodolico C, KatSarou E, Sciacco M, Garufi A, Prella A and Aguenouz M (2006) New mutations in TK2 Gene associated with mitochondrial DNA depletion. *Pediatric Neurology* 34: 177-185.
55. Chabi B, Camaret BM, Duborjal H, Issartel J and Stepien G (2003) Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: Application to diagnosis. *Molecular Diagnostics and Genetics* 49: 1309-1317.
56. Bai R and Wong L (2005) Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and overreplication in patients with mitochondrial disease. *Journal of Molecular Diagnostics* 7: 613-622.



## **CAPÍTULO IX**

---

### **Anexos**



## **Anexo I. Protocolos de extracção de DNA**

### **Anexo I.1. Extracção de DNA de sangue total ou *buffy coat* (QIAamp DNA Mini Kit – QIAGEN)**

#### **A. Preparação da amostra**

1. Centrifugar as amostras a 3000 rpm durante 10 minutos.
2. Retirar o plasma com uma pipeta Pasteur cuidadosamente (no caso de se extrair de *buffy coat*).

#### **A. Extracção**

1. Pipetar 20 µL de *QIAGEN Protease* para um *ependorf* de 1,5 mL.
2. Adicionar 200 µL da amostra ao *ependorf* (sangue total ou *buffy coat*).
3. Misturar com vortex.
4. Adicionar 200 µL de *Buffer AL*. Misturar – vortex durante 15 segundos.
5. Incubar a 56°C durante 10 minutos, tendo o cuidado de tapar os tubos com parafilme.
6. Centrifugar brevemente o *ependorf* para remover as gotículas da tampa.
7. Adicionar 200 µL de etanol (96-100%) e misturar – vortex durante 15 segundos. Centrifugar brevemente.
8. Aplicar a mistura cuidadosamente na *QIAamp Spin Column*, tendo cuidado para não molhar a tampa. Centrifugar a 8000 rpm (ou 14000 rpm quando se utiliza o *buffy coat*) durante 1 minuto. Colocar a *QIAamp Spin Column* num tubo colector limpo e rejeitar o tubo contendo o filtrado.
9. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 µL de *Buffer AW1*. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocar a coluna num tubo colector limpo e rejeitar o tubo contendo o filtrado.
10. Abrir cuidadosamente a coluna e adicionar 500 µL de *Buffer AW2*. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos.

11. Colocar a coluna num *ependorf* de 1,5 mL e descartar o tubo contendo o filtrado.
12. Adicionar 100  $\mu$ L de *Buffer AL*. Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Rejeitar a coluna.



## **Anexo I.2. Extracção de DNA de biópsia muscular e/ou hepática (Puregene<sup>®</sup> Tissue Kit - GENTRA)**

### **A. Preparação da amostra**

Triturar aproximadamente 20 mg de músculo fresco ou congelado a -70 °C. Também podem ser utilizados os *pellets* dos homogeneizados usados para o estudo enzimático da CRM. Durante a manipulação manter o músculo em gelo.

### **B. Lise Celular**

1. Colocar o músculo previamente triturado ou o homogeneizado num *eppendorf* de 1,5 mL.
2. Adicionar 500 µl de *Cell Lysis Solution* e homogeneizar, utilizando uma vareta de vidro e vortex.
3. Adicionar 3 µl de *Proteinase K Solution* (20 mg/mL). Misturar, invertendo o tubo várias vezes.
4. Incubar a 55°C durante a noite, até a solução se tornar homogénea.

### **C. Tratamento com RNase**

1. Juntar 3 µl de *RNAse Solution* (4 mg/mL) à amostra lisada.
2. Misturar a amostra invertendo o tubo várias vezes e incubar a 37°C durante 15 a 60 minutos.

### **D. Precipitação de proteínas**

1. Arrefecer a amostra à temperatura ambiente.
2. Adicionar 200 µl de *Protein Precipitation Solution* à amostra tratada.
3. Agitar no vortex durante 20 segundos e de seguida colocar no gelo 5 minutos.

4. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos, a 4°C. O precipitado de proteínas forma um fino *pellet*. Caso não se observe esse precipitado repetir os passos 3 e 4.

#### **E. Precipitação de DNA**

1. Transferir o sobrenadante, com uma pipeta, que contém o DNA para um *ependorf* de 1,5 ml contendo 600 µl de Isopropanol 100%
2. Inverter o tubo lentamente várias vezes.
3. Centrifugar a 14000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C.
4. Rejeitar o sobrenadante e secar o *pellet* com papel absorvente limpo.
5. Adicionar 600 µl de Etanol 70% e inverter o tubo várias vezes para ressuspender o DNA
6. Centrifugar a 14000 rpm, durante 1 minuto, a 4°C.
7. Decantar o etanol cuidadosamente, invertendo o tubo, de forma a não perder o *pellet*.
8. Secar com papel e deixar à temperatura ambiente o tempo suficiente para secar.

#### **F. Hidratação do DNA**

1. Adicionar 20 a 50 µl de *DNA Hydration Solution*, de acordo com o rendimento obtido.
2. Incubar a 65°C durante 1 hora ou durante a noite à temperatura ambiente, para completar a rehidratação.

Armazenar o DNA a 2-8°C ou de -20°C a -80°C.

## Anexo II. Southern Blot

### Anexo II.1. Soluções

Tabela 11. Reagentes utilizados para Southern Blot.

Solução	Reagentes	Quantidade	Observações
<b>TAE 40 x</b> (Tampão tris- acetato-EDTA)	Tris	193,6 g	
	Acetato de sódio	13,6 g	
	Na <sub>2</sub> EDTA	7,45 g	
	H <sub>2</sub> O	~800 mL	
	CH <sub>3</sub> COOH	45 mL	
	HCl qbp	pH=8	
<b>Solução de desnaturação</b>	H <sub>2</sub> O qbp	1000 mL	
	NaCl	87,65 g	
	NaOH	20,00 g	
<b>Solução de neutralização</b>	H <sub>2</sub> O qbp	1000 mL	
	Tris	175,32 g	
	NaCl	60,54 g	
	H <sub>2</sub> O	~800 mL	
<b>Tampão de pré- hibridização</b>	HCl qbp	pH = 7,5	
	H <sub>2</sub> O qbp	1000 mL	
	<i>Hybridization buffer</i>	30 ml	Agitar 2 horas. Misturar o <i>blocking reagent</i> muito cuidadosamente.
<b>Tampão de lavagem 1</b>	NaCl	0,876 g	Vf = 30 ml
	<i>Blocking reagent</i>	1,2 g	
	Ureia	60 g	Pesar ureia para gobelé de 500 ml,
	SDS	0,5 g	adicionar aprox. 400
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M pH = 7.0	50 ml	ml de ddH <sub>2</sub> O.
	NaCl	4,2 g	Adicionar o resto e
	MgCl <sub>2</sub> 1M	0,5 ml	deixar dissolver em
<i>Blocking reagent</i>	1 g	agitação. Vf = 500	
<b>Tampão de</b>	H <sub>2</sub> O qbp	500 ml	ml.
			1 semana – 4 °C.
<b>Tampão de</b>	Solução stock 20 x	20 ml	Fazer directamente

<b>lavagem 2</b> <i>(Working dilution)</i>	ddH <sub>2</sub> O	380 ml	na proveta.
	MgCl <sub>2</sub>	0,8 ml	Vf = 400 ml
<b>Tampão de lavagem 2</b> <i>(Stock 20 x)</i>	Tris base	30,25 g	Armazenar em tubos de 10 ml. -20°C até 4 meses.
	NaCl	29,22 g	
	ddH <sub>2</sub> O qbp	pH = 10 250 ml	
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M</b>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	19,5 g	Dissolver bem. Vf = 200 ml
	NaOH	pH = 7.0	
	ddH <sub>2</sub> O qbp	200 ml	
<b>MgCl<sub>2</sub> 1M</b>	MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,952 g	Dissolver bem. Vf = 10 ml
	ddH <sub>2</sub> O qpb	10 ml	
<b>SSC 20 x</b>	<b>NaCl</b>	<b>175,32 g</b>	161-0755 (BioRad)
	<b>Citrato de sódio . 2 H<sub>2</sub>O</b>	<b>88,23 g</b>	
	<b>HCl</b>	<b>pH = 7.0</b>	
	<b>ddH<sub>2</sub>O qpb</b>	<b>1000 ml</b>	

## Anexo II.2. Preparação da sonda (*Kit GE – Healthcare RPN3680*)

Nota: Ligar banho fervente.

1. Diluir 5  $\mu\text{l}$  de *cross-linker (kit)* + 20  $\mu\text{l}$  de água (*kit*). Manter em gelo. (*Working dilution*).
2. Diluir DNA previamente amplificado a 30 ng/  $\mu\text{l}$  com água (*kit*) para um volume final de 10  $\mu\text{l}$ .

Ex.: 300 ng/  $\mu\text{l}$

(1+9) ↓ dil. 1:10

30 ng/  $\mu\text{l}$

3. Colocar 10  $\mu\text{l}$  de DNA diluído num *ependorf* e desnaturar em banho fervente, 5 min.
4. Arrefecer em gelo, 5 min.
5. Agitar.
6. Adicionar 10  $\mu\text{l}$  de *reaction buffer (kit)* e agitar.
7. Adicionar 2  $\mu\text{l}$  de *labeling reagent (kit)* (fosfatase alcalina) e agitar.
8. Adicionar 10  $\mu\text{l}$  de *Working dilution* (ponto 1) e agitar (vf = 32  $\mu\text{l}$  de sonda).
9. Incubar a 37 °C, 30 min
10. Usar imediatamente ou incubar em gelo cerca de 2 horas.
11. Adicionar a sonda marcada (32  $\mu\text{l}$ ) ao tampão de pré-hibridização (30 ml).  
(**Nota:** Após utilização, reaproveitar e congelar a -20°C).

### **Anexo II.3. Reutilização da membrana (*Stripping*)**

1ª Lavagem: SSC 5 x, uma vez, 1 a 2 min.

Vf = 200 ml

50 ml SSC 20 x + 150 ml ddH<sub>2</sub>O

2ª Lavagem: SDS 0,1 % → 0,8 g + 800 ml ddH<sub>2</sub>O → fervente

3 lavagens, 10 min cada

Lavagens sempre no agitador de rolos.

Introduzir a membrana no tubo de hibridização e colocar a solução de pré-hibridização (prosseguir com o protocolo a partir da etapa Pré-Hibridização/Hibridização).

**Anexo III. Previsão dos locais de *splicing* para as novas alterações identificadas nos genes *DGUOK* e *TK2*, através do programa bioinformático *NetGene2*.**

```

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 85 nucleotides.
25.9% A, 24.7% C, 17.6% G, 31.8% T, 0.0% X, 42.4% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
      pos 5'->3' phase strand confidence 5'   exon intron 3'
      26      -   +       0.00      CTITCCCACAG^GTA AACACCT

Donor splice sites, complement strand
-----
      No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand
-----
      pos 5'->3' phase strand confidence 5'   intron exon 3'
      25      -   +       0.00      CTITCCCACAG^GTA AACACCT

Acceptor splice sites, complement strand
-----
      No acceptor site predictions above threshold.

```

**A**

```

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 85 nucleotides.
27.1% A, 24.7% C, 17.6% G, 30.6% T, 0.0% X, 42.4% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
      pos 5'->3' phase strand confidence 5'   exon intron 3'
      26      -   +       0.00      CTITCCCACAG^GTA AACACCT

Donor splice sites, complement strand
-----
      No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand
-----
      pos 5'->3' phase strand confidence 5'   intron exon 3'
      25      -   +       0.00      CTITCCCACAG^GTA AACACCT

Acceptor splice sites, complement strand
-----
      No acceptor site predictions above threshold.

```

**B**

**Figura 10.** Previsão dos locais de *splicing* para a região exão7 – intrão7 do gene *DGUOK* normal (A) e com a alteração IVS7+13 A>T (B).

```

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 85 nucleotides.
29.4% A, 22.4% C, 23.5% G, 24.7% T, 0.0% X, 45.9% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Donor splice sites, complement strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand
-----
No acceptor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, complement strand
-----
No acceptor site predictions above threshold.

```

A

```

***** NetGene2 v. 2.4 *****

The sequence: Sequence has the following composition:

Length: 85 nucleotides.
30.6% A, 22.4% C, 22.4% G, 24.7% T, 0.0% X, 44.7% G+C

Donor splice sites, direct strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Donor splice sites, complement strand
-----
No donor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, direct strand
-----
No acceptor site predictions above threshold.

Acceptor splice sites, complement strand
-----
No acceptor site predictions above threshold.

```

B

**Figura 11.** Previsão dos locais de *splicing* para a região intrão9 – exão10 do gene *TK2* normal (A) e com a alteração IVS9-13 G>A (B).