

# Genética Mitochondrial Humana

Estudos de genética molecular do DNA mitocondrial em 102 doentes portugueses



8801

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, sob a orientação do Professor Salvatore DiMauro da Columbia University, New York, coorientação da Doutora Paula Coutinho e apoio da Professora Maria João Saraiva do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar para candidatura ao grau de Doutor.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Neurologia da Columbia University, New York, sob a orientação do Professor Doutor Salvatore DiMauro e na Unidade de Biologia Clínica do Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães, Porto.

**À Sílvia e à Cristina**  
**Ao Vilarinho**  
**À minha Mãe**  
**À memória do meu Pai**

## Preceitos legais

De acordo com o disposto no nº 2 do Artº 8º do Decreto-Lei nº 388/70, esclarece-se serem da nossa responsabilidade a execução das experiências que estiveram na base dos resultados apresentados neste trabalho (excepto quando referido em contrário) assim como a sua interpretação e discussão. Nesta tese foram utilizados, em parte, os resultados contidos nos seguintes trabalhos pessoais ou de colaboração, já publicados ou em publicação:

- I **Vilarinho L**, Cardoso ML, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das citopatias mitocondriais - parte I. *Arq Med* 1997, 11 (2): 75-81.
- II **Vilarinho L**, Cardoso ML, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das citopatias mitocondriais - parte II. *Arq Med* 1997, 11 (3): 160-166.
- III **Vilarinho L**, Santorelli FM, Rosas MJ, Tavares C, Melo-Pires M, DiMauro S. The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy. *J Med Genet* 1997, 34 (7): 607-609.
- IV **Vilarinho L**, Maia C, Coelho T, Coutinho P, Santorelli FM. Heterogeneous presentation in Leigh syndrome. *J Inher Metab Dis* 1997, 20: 704-705.
- V Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, **Vilarinho L**, Hays AP, DiMauro S. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND<sub>5</sub> gene associated with MELAS. *Bioch Biophys Res* 1997, 238: 326-328.
- VI **Vilarinho L**, Santorelli FM, Cardoso M L, Guimarães A, Coutinho P. Mitochondrial DNA analysis in ocular myopathy: Observations in 29 Portuguese patients. *Eur Neurol* 1998, 39: 148-153.
- VII **Vilarinho L**, Santorelli FM, Coelho I, Rodrigues L, Maia M, Barata I, Cabral P, Dionísio A, Guimarães A, DiMauro S. The mitochondrial DNA A3243G mutation in Portugal: clinical and molecular studies in 5 families. *J Neurol Sci* 1999, 163: 168-174.
- VIII **Vilarinho L**, Rodrigues L, Coelho I, Melo Pires M, Guimarães A. Heterogeneidade clínica de seis casos com a mutação "MELAS" A3243G do DNA mitocondrial. *Acta Pediatr Port* 1999, 2; 30:149-155.
- IX **Vilarinho L**, Chorão R, Cardoso ML, Rocha H, Nogueira C, Santorelli FM. The ND1 T3308C mutation may be a mtDNA polymorphism. Report of two Portuguese patients. *J Inher Metab Dis* 1999; 22:90-91.
- X Rocha H, Flores C, Campos Y, Arenas J, **Vilarinho L**, Santorelli F M, Torroni A. About the "pathological" role of the mtDNA T3308C mutation... *Am J Hum Genet* 1999; 65(5):1457-1459.
- XI Tessa T, **Vilarinho L**, Casali C, Santorelli F M. MtDNA-related idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 1999, 7:847-848.
- XII **Vilarinho L**, Leão Teles E, Barbot C, Santos M, Rocha H, Santorelli FM. Clinical and molecular studies in three Portuguese mtDNA T8993G families. *Pediatr Neurol* 2000; 22:29-32.
- XIII Rocha G, Azevedo M, Figueiroa S, Costa FM, **Vilarinho L**. Citopatias mitocondriais. Uma doença? Várias doenças? Dois casos clínicos. *Acta Pediatr Port*, 1999; 6:30:503-507.
- XIV Santorelli FM, De Joanna G, Casali C, Tessa A, Siciliano G, Amabile GA, Pierelli F, **Vilarinho L**, Santoro LJ. Multiple mtDNA deletions: clinical and molecular correlations. *Inher Metab Dis*, 2000 (in press).

## **Sobre as razões desta dissertação**

Quando iniciei o estudo e o diagnóstico das doenças hereditárias do metabolismo, incentivada pelo fundador do Instituto de Genética Médica, Doutor Jacinto de Magalhães, impulsionador da investigação da Genética em Portugal, estava longe de prever a expansão que esta área iria ter no futuro. Até então, o diagnóstico dos défices da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) era somente equacionado num número muito reduzido de casos, na medida em que nenhum laboratório do nosso país dispunha de meios para realizar este diagnóstico, quer a nível bioquímico quer genético. Assim, foi com o incentivo do amigo e prestigiado neuropatologista Dr. António Guimarães, chefe da Unidade de Neuropatologia do Hospital Geral de Santo António, que, a partir de 1994, se procedeu ao implemento das técnicas enzimáticas dos diferentes complexos da CRM, em colaboração com a Dra Bénédicte Mousson do Service de Biochimie de l'Hôpital Debrousse de Lyon. No ano seguinte, em estreita colaboração com o Professor Salvatore DiMauro do Departamento de Neurologia da Columbia University, New York, USA, introduziram-se no nosso laboratório as técnicas de genética molecular para o estudo do DNA mitocondrial.

Movida pela convicção que este trabalho iria colmatar uma falha na medicina assistencial nacional, propus-me, determinada, a realizar este projecto conjuntamente com a chefia de um laboratório fundamentalmente de rotina e enfrentando insuficiências e dificuldades de vária índole. Foi esta convicção e o apoio incondicional da Doutora Paula Coutinho que pôs em marcha este projecto.

Após os primeiros diagnósticos, não poderia eximir-me à obrigação de aprofundar esta fascinante área e, assim, dar o meu contributo ao fomento da investigação e ensino assumida pelo Instituto de Genética Médica Jacinto de Magalhães.

Ao longo destes anos, o meu trabalho nesta área traduziu-se em várias publicações e comunicações científicas que espelham bem o interesse e a importância da Medicina Mitocondrial.

# ÍNDICE GERAL

	pág.
<b>PARTE I INTRODUÇÃO E ESTADO ACTUAL DO CONHECIMENTO.....</b>	<b>1</b>
<b>Citopatias mitocondriais.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Mitocôndria .....</b>	<b>4</b>
1.1 Origem, estrutura e organização.....	4
1.2 Função .....	7
1.3 Organização e expressão do genoma mitocondrial.....	16
1.4 Caracterização da genética mitocondrial.....	20
<b>2. Classificação das citopatias mitocondriais.....</b>	<b>23</b>
2.1 Perspectiva histórica da OXPHOS.....	24
2.2 Bioquímica da OXPHOS.....	25
2.3 Histologia associada a défices da OXPHOS.....	34
<b>3. Mutações associadas à OXPHOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Doenças associadas a mutações pontuais do mtDNA de transmissão materna.....	38
3.2 Doenças associadas a alterações espontâneas do mtDNA .....	43
3.3 Doenças associadas a rearranjos no mtDNA de transmissão materna.....	44
3.4 Doenças associadas a alterações do mtDNA de transmissão mendeliana.....	44
3.5 Doenças mitocondriais associadas a mutações do nDNA de transmissão mendeliana.....	46
3.6 Mutações adquiridas do mtDNA.....	49
<b>Nota final.....</b>	<b>50</b>
<b>PARTE II PROJECTO DE INVESTIGAÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>Objectivos deste trabalho.....</b>	<b>53</b>
<b>PARTE III TRABALHO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>57</b>
<b>1. Selecção de doentes .....</b>	<b>59</b>
1.1 Origem e período de estudo.....	59
1.2 Metodologia.....	59
1.2.1 Critérios de suspeita clínica.....	59
1.2.2 Critérios de suspeita miopatológica.....	64
1.2.3 Critérios de suspeita bioquímica .....	65
1.3 Doentes seleccionados.....	69
<b>2. Investigação molecular do mtDNA em doentes portugueses com citopatia mitocondrial.....</b>	<b>77</b>
2.1 Introdução.....	77
2.2 Doentes e métodos.....	81
2.3 Resultados e discussão.....	92

<b>3. Discussão global e perspectivas.....</b>	<b>117</b>
3.1 Actualidade e importância do trabalho.....	117
3.2 Heterogeneidade clínica.....	118
3.3 Heterogeneidade miopatológica.....	126
3.4 Heterogeneidade bioquímica.....	127
3.5 Heterogeneidade molecular.....	131
3.6 Terapia e prognóstico.....	139
3.7 Aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal.....	140
3.8 Perspectivas.....	141
<b>PARTE IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>145</b>
<b>PARTE V RESUMOS.....</b>	<b>175</b>
Resumo.....	177
Summary.....	179
Résumé.....	181
<b>PARTE VI ANEXOS.....</b>	<b>183</b>
Agradecimentos.....	185
Abreviaturas.....	187
Anexo I – Técnicas enzimáticas para estudo da CRM.....	189
Anexo II – Sintomas e sinais constantes da informação clínica registados.....	197
Anexo III – Dados clínicos, miopatológicos e bioquímicos de 102 doentes com citopatia mitocondrial.....	201
Anexo IV – Resultados da determinação das actividades enzimáticas dos comple- xos da CRM.....	203
Anexo V – <i>Primers</i> do mtDNA utilizados neste estudo na pesquisa de mutações menos frequentes.....	205
Anexo VI – Resultados moleculares globais.....	207

**Parte I**

---

**Introdução e Estado Actual do Conhecimento**

## ***Citopatias Mitocondriais***

As citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças que se caracterizam por alterações do funcionamento da mitocôndria e que cursam com um largo espectro de sintomas e sinais envolvendo órgãos de diferente origem embrionária (DiMauro *et Moraes*, 1993; De Vivo *et al*, 1993; Ruitenbeek *et al*, 1996<sup>a</sup>; DiMauro *et Schon*, 1998). Durante vários anos as doenças mitocondriais foram consideradas exclusivamente neuromusculares (Zeviani *et al*, 1996), mas devido à natureza ubiquitária da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e ao perfil metabólico dos principais órgãos ser muito diferente, um défice da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) deve ser equacionado nos doentes que apresentam vários tipos de situações: (1) uma associação de sintomas neuromusculares e/ou não-neuromusculares; (2) uma evolução rápida e progressiva; (3) o envolvimento de órgãos com diferente origem embrionária.

Este tipo de patologia pode estar associado a qualquer sintoma, a qualquer tipo de hereditariedade e manifestar-se em qualquer fase da vida, desde o nascimento até à idade mais avançada. A característica mais relevante é o número crescente de tecidos afectados com a evolução da doença estando o sistema nervoso central (SNC) muitas vezes envolvido. Geralmente os sintomas iniciais persistem e agravam-se gradualmente, mas podem ocasionalmente regredir e até desaparecer enquanto outros órgãos começam a ficar afectados. Na verdade, remissão acentuada de pancitopenia e diarreia líquida têm sido referidas em lactentes que mais tarde desenvolvem um envolvimento de outros órgãos. Certas características clínicas ou associações são mais frequentes em certas idades e têm sido classificadas como identidades distintas, sugerindo que estas associações não são fortuitas (Munnich *et al*, 1996).

As disfunções da CRM, provocam uma modificação no estado de oxido-redução celular (Jeong-yu *et al*, 1996) que se reflecte num aumento de lactato e corpos cetónicos plasmáticos (Adams *et al*, 1996). Estas alterações tornam-se particularmente evidentes após esforço ou sobrecarga de glicose (Poggi-Travert *et al*, 1996). Podem ser investigadas através da determinação da actividade enzimática dos diversos complexos da CRM (Shanske *et al*, 1994) para identificação do nível em que se encontram os défices. Com o tempo, esta perturbação do metabolismo oxidativo leva a alterações estruturais celulares detectáveis na biópsia muscular.

Este tipo de patologia deve ser equacionado no diagnóstico diferencial de

doenças isoladas ou familiares, já que alguns casos têm associada uma forma de hereditariedade não mendeliana (transmissão materna); só um diagnóstico laboratorial completo incluindo estudos histopatológico, bioquímico e de genética molecular da biópsia muscular, permite o aconselhamento genético familiar adequado (Ruitenbeek *et al.*, 1996<sup>b</sup>).

Os aspectos mais relevantes para a confirmação do diagnóstico são: presença de "fibras rasgadas e vermelhas" (*ragged-red fibers*-RRFs), acidose láctica, deficiência específica de pelo menos um complexo da CRM e alterações genéticas do DNA mitocondrial (mtDNA) ou nuclear (nDNA).

Nos capítulos seguintes serão abordados os critérios de selecção dos doentes estudados com base nos dados clínicos e laboratoriais e os estudos de genética mitocondrial efectuados.

## 1. Mitocôndria

As mitocôndrias\* são organelos celulares com forma, tamanho e estrutura muito característicos que possuem ácido desoxirribonucleico (DNA) próprio. Estes organelos estão presentes no citoplasma das células eucarióticas e desempenham funções vitais na produção aeróbia de energia. Actualmente as mitocôndrias possuem um interesse relevante, particularmente na investigação da morte celular, na biologia evolucionista, na medicina molecular e na ciência forense.

### 1.1. Origem, estrutura e organização

#### Origem

Apesar de existirem nos organismos eucariotas e seus ancestrais há mais de 1000 milhões de anos (Grivell, 1983), as mitocôndrias só foram identificadas pela primeira vez em 1890 por Altman. Décadas depois, foram descritos os citocromos (Keilin, 1925) tendo esta descoberta aberto caminho para a definição de cadeia respiratória.

Nos anos quarenta, Krebs descreveu todos os passos intermediários do ciclo do ácido cítrico, Kennedy e Lenhinger mostraram que estavam localizados nas mitocôndrias: o ciclo de Krebs, a oxidação dos ácidos gordos e a fosforilação oxidativa.

---

\* Mitocôndria provém da conjugação de dois vocábulos gregos "mitos" que significa filamento e "chondros" grão (Benda, 1898).

Claude identificou-as como centro da respiração intracelular e do metabolismo energético. Em 1953, Palade *et al*, descreveram a estrutura bimembranar das mitocôndrias e, cinco anos mais tarde, McLean, descobriu que as mitocôndrias podem sintetizar proteínas.

Durante muitos anos pensou-se que as mitocôndrias eram descendentes de organismos relacionados com as bactérias, com vida e respiração própria (Margulis, 1967). Esta teoria está de acordo com a hipótese largamente aceite (Margulis, 1970 e 1981; Köchel *et* Künzel, 1981; Wallace *et al*, 1982; Gray *et* Doolittle, 1982) da endossimbiose entre uma espécie bacteriana e uma célula anaeróbia. Esta simbiose provou ter vantagens evolutivas, dado que a bactéria anaeróbia passou a poder metabolizar oxigénio, previamente tóxico para as células.

Estudos recentes efectuados em eucariotas unicelulares (protistas) questionam a endossimbiose seriada tradicional (Gray *et al*, 1999), sugerindo que a mitocôndria teve um ancestral comum a todos os eucariotas e colocam a hipótese deste organelo ter tido uma origem simultânea com os componentes nucleares destas células.

### **Estrutura**

As mitocôndrias são estruturas alongadas com dimensões aproximadas às de uma bactéria (1-2  $\mu\text{m}$  de comprimento por 0,1-0,5  $\mu\text{m}$  de largura), podendo variar em comprimento e forma embora a largura se mantenha constante. Existem milhares de mitocôndrias em cada célula e, no músculo esquelético do adulto elas ocupam cerca de 4% do volume total de fibras. Estão localizadas entre as miofibrilhas sob a membrana plasmática, onde formam aglomerados junto aos capilares, ao núcleo e às placas da junção neuromuscular. As mitocôndrias contêm duas membranas a externa e a interna separadas por um espaço intermembranar (Figura I-1): (i) A membrana externa da mitocôndria é lisa, separa o organelo do citoplasma e é permeável à maior parte das pequenas moléculas e iões. Esta membrana contém numerosas enzimas importantes tais como a monoamino oxidase, a sintetase dos acilcoenzima A (acilCoA) dos ácidos gordos de cadeia longa, a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), assim como receptores e outros componentes chave do sistema de transporte transmembranar das proteínas.

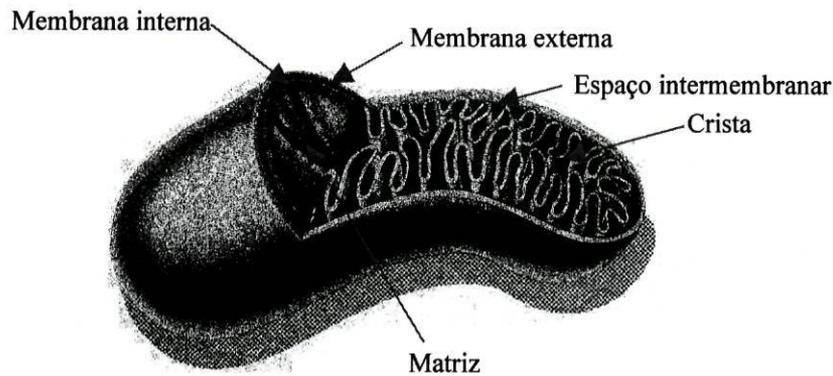


Figura I-1 Representação esquemática da mitocôndria.

(ii) A membrana interna é invaginada originando cristas onde estão localizadas as subunidades dos complexos multienzimáticos, os transportadores de elétrons móveis da CRM, e a OXPHOS. A quantidade de cristas existentes está relacionada com as necessidades energéticas específicas de cada tecido. Esta membrana é constituída por uma grande quantidade de proteínas e fosfolípidos, especialmente cardiolipina, e é impermeável à maior parte dos metabolitos hidrofílicos e ionizados. Assim, a velocidade de transporte destas moléculas para a matriz mitocondrial e para o exterior da mitocôndria é mediada pela presença na membrana interna de transportadores específicos ou translocases. A matriz mitocondrial está envolvida pela membrana interna. Três quartos das proteínas desta membrana constituem os complexos da CRM e a adenosina trifosfato sintetase (ATPase) (Tyler, 1992).

### Organização

Estão localizadas na matriz mitocondrial numerosas vias metabólicas importantes, como o ciclo de Krebs, o complexo da piruvato desidrogenase (cPDH), as enzimas da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos presentes, à exceção das acildesidrogenases dos ácidos gordos de cadeia muito longa (VLCAD) e da proteína trifuncional (TP) localizadas na membrana interna, e o sistema da OXPHOS também localizado ao nível da membrana interna (Figura I-2).

As enzimas da matriz mitocondrial contribuem para a biossíntese de muitos outros metabolitos chave tais como a ureia, as cetonas, vários aminoácidos, as pirimidinas, os nucleotídeos e o heme. A matriz contém ainda 2 a 10 moléculas de

mtDNA de cadeia dupla, assim como peptidases e chaperoninas necessárias para o processamento e acoplamento das proteínas mitocondriais importadas.

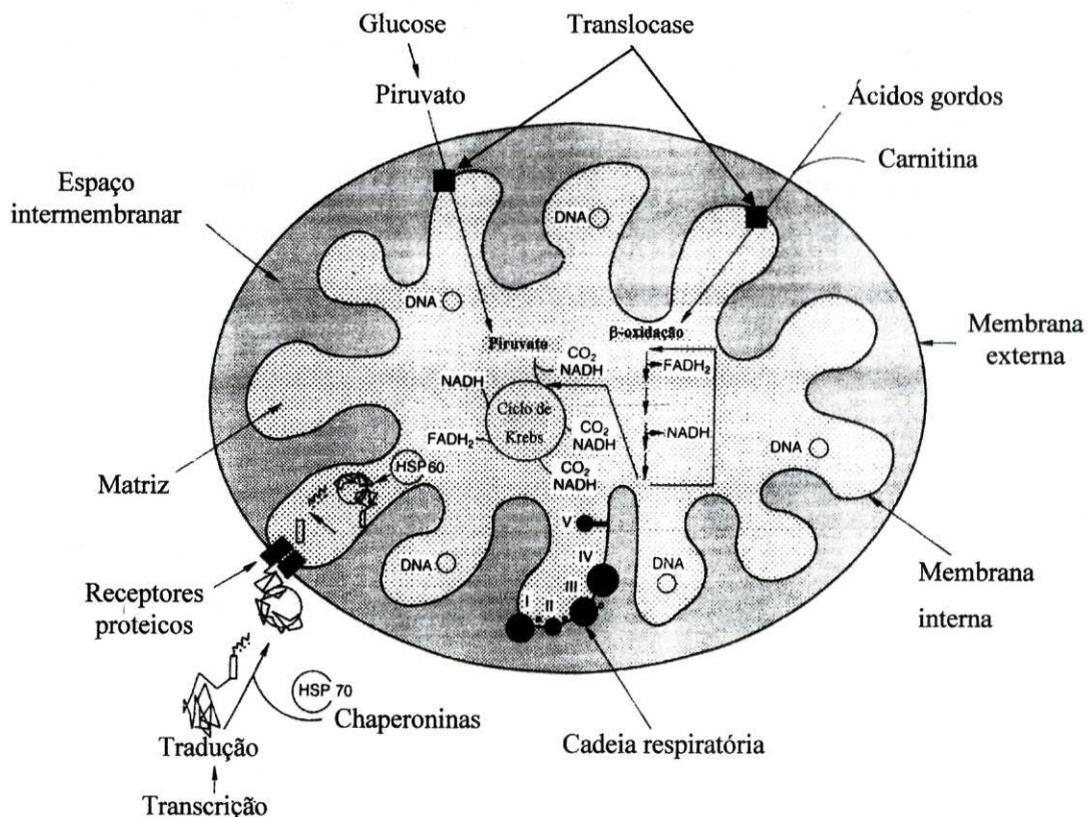


Figura I-2 Diagrama de uma mitocôndria estilizada mostrando os componentes estruturais e vias metabólicas mais importantes (adaptado de Cooper *et* Clark, 1994).

## 1.2. Função

As mitocôndrias são componentes essenciais das células eucarióticas e desempenham um papel fundamental no metabolismo celular. A sua principal função nos órgãos aerobiamente activos, como o cérebro, coração e o músculo esquelético, é a conservação da energia química proveniente das oxidações biológicas para posterior síntese de ATP.

Os principais substratos oxidados pelas mitocôndrias musculares são o piruvato e os ácidos gordos livres. O piruvato (produto da glicólise) é proveniente parcialmente da glucose sanguínea, mas fundamentalmente do catabolismo do glicogénio endógeno (que é sintetizado e armazenado dentro das fibras musculares nos períodos de repouso). A produção máxima de piruvato ocorre no decurso de esforço momentâneo e nos estados iniciais de exercício intenso quando o glicogénio é a fonte obrigatória ou

preferencial. Uma vez formado, o piruvato pode ser reduzido a lactato, transaminado a alanina no citoplasma, ou ainda oxidado a acetilcoenzima A (acetilCoA) na mitocôndria.

Para além do piruvato, também as estruturas carbonadas dos ácidos orgânicos nutricionais e da maior parte dos aminoácidos são degradadas na mitocôndria para produzir acetilCoA. A maior parte da acetilCoA que deriva da oxidação dos carboidratos e lípidos vai ser condensado com o oxaloacetato para formar citrato (Figura I-3) que é posteriormente oxidado, numa sequência de nove reacções catalíticas cíclicas que regeneram oxaloacetato (ciclo de Krebs).

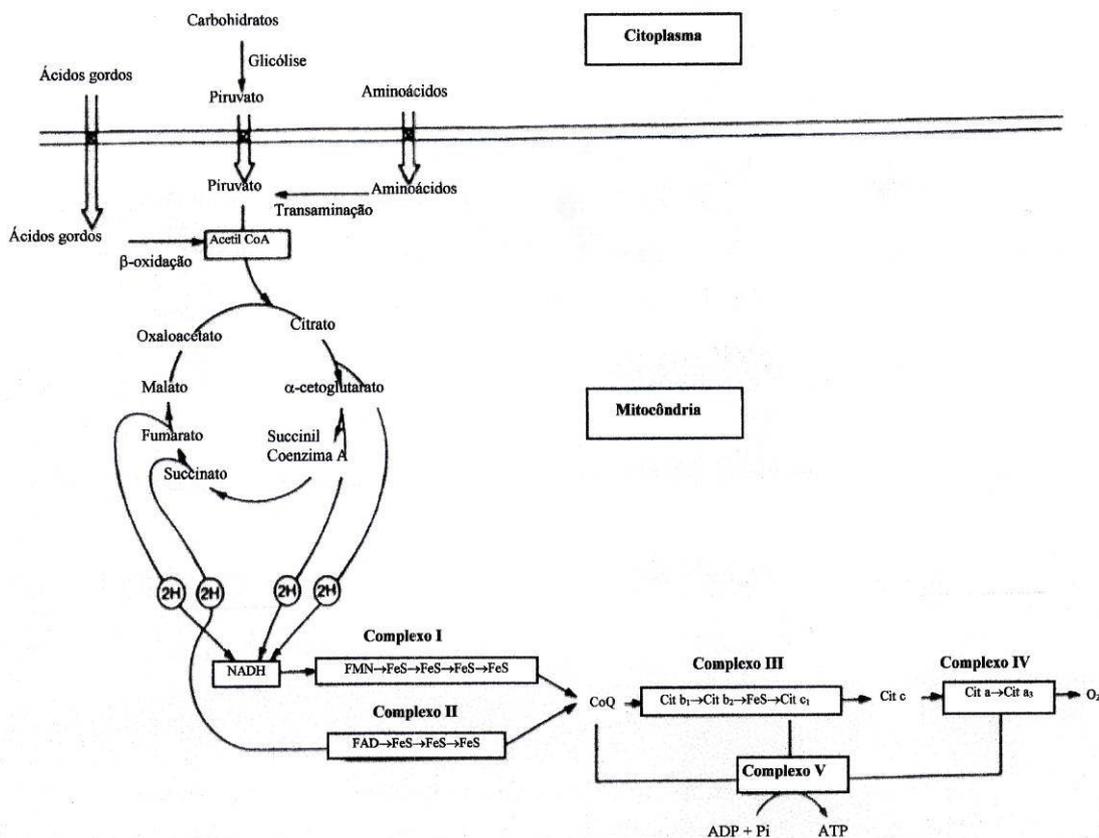


Figura I-3 Metabolismo intermediário (adaptado de DiMauro, 1993).

Por cada grupo acetilo que entra no ciclo são libertadas duas moléculas de CO<sub>2</sub> e quatro pares de átomos de hidrogénio que são utilizados para reduzir três moléculas de NAD<sup>+</sup> a NADH e uma molécula de FAD a FADH<sub>2</sub>. A localização estratégica do ciclo de Krebs na matriz, na proximidade da cadeia respiratória, permite que a reoxidação dos cofactores reduzidos se processe de imediato.

## Cadeia respiratória e fosforilação oxidativa

A CRM é constituída por moléculas transportadoras de electrões que vão sofrer reacções de oxido-redução à medida que os equivalentes reduzidos são transferidos até ao oxigénio molecular (Figura I-4). Estas moléculas podem ser compostos orgânicos relativamente simples como a ubiquinona, nucleótidos como o NADH, ou possuir uma estrutura proteica como é o caso das flavoproteínas, das ferro-sulfoproteínas e dos citocromos.

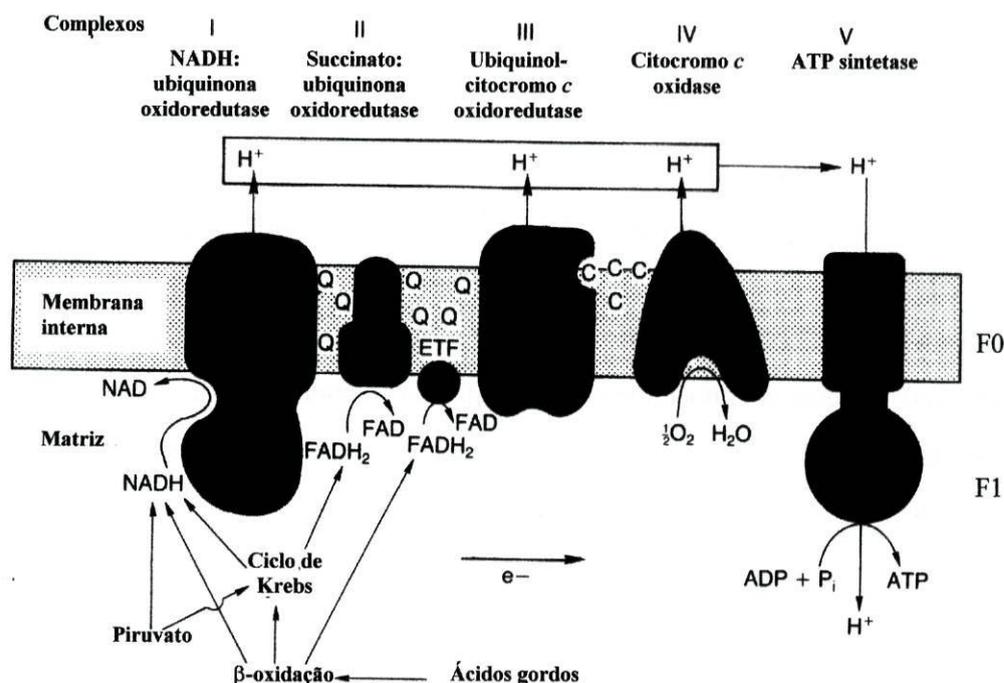


Figura I-4 Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial (adaptado de Cooper et Clark, 1994).

A estrutura membranar 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.

A OXPHOS é constituída por cinco complexos enzimáticos lipo-proteicos: complexo I (NADH:ubiquinona oxidoreductase, EC 1.6.5.3), complexo II (succinato:ubiquinona oxidoreductase, EC 1.3.5.1), complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase, EC 1.10.2.2), complexo IV (citocromo c oxidase, EC 1.9.3.1), e complexo V (ATP sintetase, EC 3.6.1.34) (Quadro I-1). Estes complexos contêm flavinas (FMN, FAD) e compostos

metálicos [proteínas com grupos ferro-enxofre (Fe-S), hemes, proteínas com cobre]. Os complexos I a IV constituem a CRM, embora o complexo succinato desidrogenase faça também parte integrante do ciclo de Krebs.

Os complexos I e II recebem electrões provenientes das diferentes desidrogenases e transferem-nos para um composto quinóide, a ubiquinona ou coenzima  $Q_{10}$ . Seguidamente, os electrões são enviados para o complexo III, citocromo *c*, complexo IV e finalmente reagem com o aceitador final dos electrões, o oxigénio. 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 e produzem um gradiente de prótons. O complexo V utiliza a energia potencial armazenada no gradiente de prótons para condensar o ADP e o fosfato inorgânico (Pi) em ATP, formando-se três moléculas de ATP por cada NADH oxidado.

O ATP sintetizado é transportado através da membrana interna e o ADP citoplasmático regressa à mitocôndria via adenina nucleótido translocase (ANT), enzima complexa localizada na membrana interna da mitocôndria e que faz o intercâmbio entre o ADP citosólico e o ATP mitocondrial (Lenhinger, 1982; Klingenberg *et al.*, 1980). Atendendo a que o ADP é o substrato limitante da velocidade da OXPHOS, a ANT pode ter um papel importante na regulação energética mitocondrial (Kholodenko, 1984).

A OXPHOS produz 17 a 18 vezes mais ATP do que a obtida a partir da mesma quantidade de glucose só por glicólise.

É essencial para a célula a redução completa de cada molécula de  $O_2$  com formação de duas moléculas de  $H_2O$ , pois as reduções incompletas originam peróxido de hidrogénio e o radical superóxido, tóxicos para as células dado que oxidam os lípidos membranares e provocam alterações no material genético. As mitocôndrias podem provocar a morte celular de variadas formas devido: (i) a um bloqueio no transporte electrónico com consequente alteração do metabolismo energético, (ii) à inactivação/activação das proteínas que medeiam a morte celular programada (apoptose) e (iii) à alteração do potencial redox celular. Qualquer um destes mecanismos pode ajudar a explicar como os defeitos mitocondriais contribuem para a patogénese das doenças degenerativas humanas, envelhecimento e cancro.

Quadro I-1 Estrutura e função dos complexos da CRM

Complexo	Designação	Função	Sub-unidades	Grupos prostéticos	Observações
I	NADH:ubiquinona oxidoreductase	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Oxidação do NADH a NAD</li> <li>•Transferência de electrões para ubiquinona reduzindo-a a ubiquinol (UQH<sub>2</sub>)</li> <li>•Bomba de protões</li> </ul>	≈ 42	<ul style="list-style-type: none"> <li>•8-9 FeS</li> <li>•FMN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•O maior complexo</li> <li>•7 subunidades codificadas pelo mtDNA e 35 pelo nDNA</li> </ul>
II	Succinato:ubiquinona oxidoreductase	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Oxidação do succinato a fumarato</li> <li>•Transferência de electrões para a ubiquinona produzindo (UQH<sub>2</sub>)</li> </ul>	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>•FAD</li> <li>•3 FeS</li> <li>•Cit <i>b</i><sub>560</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Succinato desidrogenase faz parte do complexo</li> <li>•Faz parte da CRM e ciclo de Krebs</li> <li>•Nenhuma subunidade codificada pelo mtDNA</li> </ul>
III	Ubiquinol-citocromo <i>c</i> oxidoreductase	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Reoxidação do cit <i>c</i></li> <li>•Transferência de electrões para cit <i>c</i></li> <li>•Bomba de protões</li> </ul>	11	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Cit <i>b</i><sub>L</sub> (566nm), <i>b</i><sub>H</sub> (562nm) e <i>c</i><sub>1</sub></li> <li>•FeS (Rieske)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Cit <i>b</i> – molécula com dois locais activos</li> <li>•Apoproteína cit <i>b</i> é codificada pelo mtDNA</li> </ul>
IV	Citocromo <i>c</i> oxidase	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Reoxidação do cit <i>c</i></li> <li>•Transferência de electrões para oxigénio molecular</li> <li>•Bomba de protões</li> </ul>	13	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Cit <i>a</i> + <i>aa</i><sub>3</sub></li> <li>•3 átomos cobre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Reduz o oxigénio molecular</li> <li>•As 3 maiores subunidades codificadas pelo mtDNA (I, II e III)</li> </ul>
V	ATP sintetase (Mg <sup>2+</sup> -ATPase)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Utiliza o gradiente electroquímico para a síntese de ATP a partir ADP e Pi</li> <li>•Gradiente de protões reverso</li> </ul>	12-14	•Nenhum	•2 subunidades codificadas pelo mtDNA

Abreviaturas: NAD-dinucleotídeo de adenina e  $\alpha$ -nicotinamida; NADH-a respectiva forma reduzida; cit-citocromo; Pi-fósforo inorgânico; FMN-mononucleótido de flavina; cit *c*-citocromo *c*; cit *b*-citocromo *b*; cit *a*-citocromo *a*; ATP-adenosina trifosfato; ADP-adenosina difosfato; FAD-dinucleotídeo de adenina e flavina.

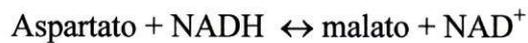
### Complexo I

O complexo I é o maior complexo da CRM e o melhor estudado (Loeffen *et al*, 1998; Smeitink *et al*, 1998) em parte devido ao trabalho de Walker *et al*, 1992 que tinha caracterizado o complexo homólogo de bovino.

As desidrogenases dependentes de NAD presentes no citoplasma são as enzimas glicolíticas: desidrogenase gliceraldeído-fosfato e desidrogenase láctica.

Devido ao facto da molécula de NADH não ter capacidade para atravessar a

membrana interna mitocondrial, o vaivém malato-aspartato transporta os equivalentes reduzidos através daquela membrana, cedendo os electrões ao  $\text{NAD}^+$  presente na matriz mitocondrial para formar NADH.



As principais desidrogenases dependentes do NADH e existentes na mitocôndria são: a PDH, as desidrogenases isocítrica,  $\alpha$ -cetoglutárica e málica, enzimas do ciclo de Krebs; a 3-hidroxiacilCoA desidrogenase do ciclo da  $\beta$ -oxidação; a glutamato desidrogenase do catabolismo dos aminoácidos; e a  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase, que participa na formação dos corpos cetónicos. Os NADH formados nestas reacções são fornecidos ao complexo I através de uma interacção enzimática (desidrogenase dependente do NAD-complexo I).

Os polipeptídeos do complexo I podem ser divididos em três grandes grupos: o grupo flavoproteico, o fragmento Fe-proteína e o fragmento proteico hidrofóbico (Ragan, 1987). Do complexo I os electrões passam para a ubiquinona através de uma longa série de grupos redox que incluem três flavoproteínas (Fps), sete proteínas Fe-S e 24 proteínas hidrofóbicas (HPs) (Smeitink *et al*, 1999).

Segundo Walker *et al*, 1992 e Skehel *et al*, 1998, este complexo tem identificadas 42 subunidades diferentes, sendo 7 codificados pelo mtDNA (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6), (Chomyn *et al*, 1986) e pelo menos 35 pelo nDNA (Smeitink *et al*, 1998).

O fragmento flavoproteico é constituído fundamentalmente pelo mononucleótido de flavina (FMN), seis átomos de Fe e três polipeptídeos (51, 24 e 10 KDa), (Ragan, 1982). O polipeptídeo 51-KDa tem sido referido como sendo o local de ligação do NADH ao FMN. Nove dos dez átomos de Fe estão presentes no fragmento Fe-proteína. A proteína de 15-KDa deste fragmento parece ser a proteína de ligação da ubiquinona envolvendo a transferência de electrões à ubiquinona (Suzuki *et al*, 1986). O fragmento proteico hidrofóbico contém os centros Fe-S que possivelmente são os dadores de electrões à ubiquinona (Ohnishi *et al*, 1985).

O complexo I é sensível a um número de inibidores tais como a rotenona, a piericidina A, a 1-metil-4-fenilpiridina, o difenileneiodónio e amitil. A rotenona, o mais potente inibidor, e os seus análogos ligam-se ao nível do gene ND1 (Earley *et al*, 1984).

Actualmente é conhecida a localização de 26 e a estrutura completa de 6 dos 35 genes nucleares (Emahazion *et Brookes*, 1998; Emahazion *et al*, 1998). O transporte dos produtos dos genes nucleares do complexo I através da membrana interna mitocondrial é que ainda não se encontra esclarecido.

### **Complexo II**

O complexo II é o menor complexo da CRM e tem um papel importante num passo fundamental do ciclo do ácido cítrico, no qual o succinato é desidrogenado a fumarato e os electrões são fornecidos à ubiquinona ao nível da membrana interna da mitocôndria. Está localizado na membrana mitocondrial interna em contacto directo com a matriz (Clarkson *et al*, 1991) e é o único complexo da OXPHOS codificado exclusivamente pelo nDNA e não envolvido na translocação dos protões.

Contém quatro subunidades polipeptídicas: uma subunidade de 70-KDa, uma flavoproteína (Fp) que contém FAD em ligação covalente, uma subunidade de 27-KDa, uma proteína Fe-S (Ip) que contém 3 grupos Fe-S e os polipeptídeos membranares de 15,5-KDa e 13,5-KDa que contém hemes tipo b (Davis KA *et al*; 1971, Hatefi *et al*, 1980). A subunidade Ip pode servir como uma ponte entre as subunidades Fp e os polipeptídeos membranares.

As propriedades catalíticas do complexo II são semelhantes às da fumarato redutase bacteriana que podem ter sido seus ancestrais no processo evolutivo. O succinato actua simultaneamente como um substrato e um modelador positivo da actividade específica do complexo II na mitocôndria intacta, nas preparações membranares e nas preparações da succinato desidrogenase purificada (Zheng *et al*, 1990).

### **Complexo III**

O complexo III, situado na parte média da CRM, catalisa a transferência electrónica entre dois transportadores móveis de electrões, ubiquinol e citocromo *c* e também faz a translocação de protões através da membrana mitocondrial interna. No complexo III das mitocôndrias bovinas foram identificadas 11 subunidades polipeptídicas através da electroforese num gel de dodecilsulfato, sendo designadas subunidades de I a XI (González-Halphen *et al*, 1988). Estas subunidades são: proteínas core I e II, citocromo *b*, citocromo *c*<sub>1</sub>, proteína Fe-S, e quatro ou cinco polipeptídeos de baixo peso molecular. Os grupos redox primários para o complexo III são: citocromo

*b566* de baixo potencial e citocromo *b562* de alto potencial (subunidade III), citocromo *c<sub>1</sub>* (subunidade IV) e o centro nuclear Fe-S não heme (centro Fe-S de Rieske, subunidade V), os quais estão presentes numa razão molar 2:1:1 (Rieske, 1976). As proteínas *core* não contêm grupos redox e parecem não participar directamente na reacção de transferência electrónica. Contudo, a dissociação de duas proteínas *core* do complexo III da *Neurospora crassa*, interrompe a transferência electrónica, o que sugere que estas proteínas têm um papel importante na manutenção da orientação correcta dos grupos redox (Linke *et al*, 1986). Estudos na *Saccharomyces cerevisiae* indicam que as proteínas *core* são essenciais para uma correcta ligação do complexo III (Crivellone *et al*, 1988).

O citocromo *b* é o único polipeptídeo do complexo III codificado pelo mtDNA. Esta subunidade contém dois grupos heme (Wikstrom *et al*, 1984) e é muito hidrofóbica, pois contém oito ou nove segmentos transmembranares (Saraste, 1984). O citocromo *b* é o maior componente transmembranar do complexo III e está localizado na região central da enzima paralelamente às subunidades I e II (González-Halpen *et al*, 1988). O citocromo *c<sub>1</sub>* é uma proteína anfipática que contém um local hidrofílico com um heme ligado covalentemente a um segmento simples que atravessa a membrana (Weiss *et al*, 1987).

Esta subunidade está localizada na parte externa da membrana mitocondrial interna e inter-actua directamente com o citocromo *c*. A proteína Fe-S não heme localiza-se no lado citoplasmático da membrana mitocondrial interna e está situada entre o citocromo *b* e o citocromo *c<sub>1</sub>* (González-Halphen *et al*, 1988).

O mecanismo para a transferência de electrões e translocação de protões pelo complexo III não está bem esclarecido. Os modelos possíveis para este processo são o ciclo ubiquinona bomba de protões (Q) e o b-ciclo (Mitchell, 1976; Hatefi, 1985; Trumpower, 1981). Nestes modelos, pode considerar-se que o complexo III tem dois centros cataliticamente activos que reagem com a *pool* ubiquinona, um no lado citoplasmático (Q<sub>o</sub>) e outro no lado da matriz mitocondrial (Q<sub>i</sub>) da membrana mitocondrial interna (Ohnishi *et al*, 1980; Robertson *et al*, 1988). Ambos os modelos relacionam a translocação de proteína e transferência de electrões com um processo no qual os electrões se movem através dos intermediários redox da ubiquinona (Hatefi, 1985; Wikstrom *et al*, 1986).

### Complexo IV

O complexo IV (citocromo *c* oxidase) é o último complexo enzimático do transporte electrónico. Recebe os electrões após terem sido transferidos do citocromo *c* reduzido e fornece-os ao oxigénio. Em conjugação com este processo, os protões são bombeados através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranar. O complexo IV é composto por treze subunidades polipeptídicas (Kadenbach *et al*, 1983; Verheul *et al*, 1979). De acordo com a nomenclatura de Kadenbach *et al*, 1983, as subunidades I, II e III são codificadas pelo mtDNA e as restantes subunidades (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, VIII) são codificados pelo nDNA. A subunidade II contém também um local de ligação ao citocromo *c*.

À subunidade III tem sido atribuído um papel na translocação de protões dado que a diciclohexilcarbodimida (DCCD), uma toxina respiratória que tem sido utilizada para ligar o glutamato ao polipeptídeo da subunidade III na posição 90, inibe preferencialmente a translocação de protões (Prochaska *et al*, 1981).

### Complexo V

O complexo V utiliza o gradiente electroquímico originado pelos complexos I, III e IV como fonte de energia para a síntese de ATP a partir de ADP + Pi. A enzima ATP sintetase é composta por duas partes: o segmento F<sub>1</sub>, que cataliza a síntese de ATP, e o segmento F<sub>0</sub>, que faz a translocação dos protões na matriz mitocondrial (Hatefi, 1985; Kagawa *et al*, 1966).

Quando o segmento F<sub>1</sub> é purificado a partir do F<sub>0</sub>, cataliza a conversão de ATP em ADP+ Pi. No complexo V, a síntese de ATP é acoplada funcionalmente ao transporte electrónico através dos complexos I, III, e IV e à redução de oxigénio.

Na mitocôndria, o transporte de electrões e o consumo de oxigénio aumenta quando o ADP está disponível, e diminui até a um nível mínimo constante quando o ADP é limitado.

O *coupling* mitocondrial é habitualmente medido pela polarografia da OXPHOS. O eléctrodo de Clark usa-se para medir o consumo de oxigénio pelas mitocôndrias que estão a utilizar um substrato oxidável dentro de uma câmara fechada. O baixo consumo de oxigénio devido à oxidação do substrato na ausência de ADP é referido como o estado 4 da respiração. O aumento rápido no consumo de oxigénio seguido da adição de ADP é chamado o estado 3 da respiração. A razão do controlo respiratório (RCR) é a

relacção entre o estado 3 e o estado 4 da respiração e indica em média a quantidade de *coupling*. A RCR aproxima-se do valor de 1 à medida que as mitocôndrias se tornam progressivamente mais *uncoupled*. Diferenças na velocidade de consumo de oxigénio entre o estado 3 de respiração e a velocidade com um *uncoupler*, podem sugerir uma alteração no funcionamento do complexo V.

O complexo V é composto por 14 subunidades (nove subunidades na fracção F<sub>0</sub> e cinco na fracção F<sub>1</sub>), sendo duas codificadas pelo mtDNA (os genes ATPase 6 e 8) e as restantes codificadas pelo nDNA. A sua actividade máxima requer uma ligação firme à cardiolipina.

### 1.3. Organização e expressão do genoma mitocondrial

#### DNA mitocondrial

As mitocôndrias são os únicos organelos das células animais a possuir DNA próprio, designado por mtDNA. A sua presença foi referida pela primeira vez em 1963 (Nass *et al.*) na matriz mitocondrial de células embrionárias de frango, e comprovada através da destruição específica pela desoxirribonuclease. Cada célula possui milhares de moléculas de mtDNA com cerca de 5 cópias (entre 2 a 10) por mitocôndria (Satoh *et al.*, 1991), o que corresponde a 0,4% do DNA celular.

O genoma mitocondrial humano (Figura I-5) é constituído por uma pequena molécula circular de DNA de cadeia dupla, com 16.569 pares de bases (pb) (Anderson *et al.*, 1981) e contém 37 genes que codificam para dois RNAs ribossómicos (rRNAs), 22 RNAs de transferência (tRNAs) e 13 RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam 13 polipeptídeos componentes da cadeia respiratória mitocondrial-fosforilação oxidativa e que incluem (Zeviani *et al.*, 1989):

- sete subunidades do Complexo I ou NADH - coenzima Q oxidoreductase (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6);
- uma subunidade do Complexo III ou coenzima Q - citocromo *c* oxidoreductase (citocromo b);
- três subunidades do Complexo IV, citocromo *c* oxidase ou COX (COI, COII, COIII);
- duas subunidades do Complexo V ou ATP sintetase (ATPase 6 e ATPase 8).

A cadeia dupla é composta por uma cadeia pesada H (*heavy*) rica em purinas

(guanina e adenina) e uma cadeia leve L (*light*) rica em pirimidinas (citosina e timina). A nomenclatura “pesada” e “leve” refere-se à diferente mobilidade das cadeias separadas em gradientes alcalinos de cloreto de cézio. A cadeia pesada codifica para dois rRNAs (12S e 16S), 14 tRNAs, seis subunidades do complexo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5), apocitocromo b do complexo III, três grandes subunidades do complexo IV (COX I, COXII, COXIII) e duas subunidades do complexo V (ATPase 6, ATPase 8). A cadeia leve codifica oito tRNAs e uma subunidade do complexo I (ND6).

No mtDNA as regiões não codificantes, à excepção de um pequeno segmento, o D-loop (*displacement loop*), são escassas e alguns genes são mesmo parcialmente sobreponíveis.

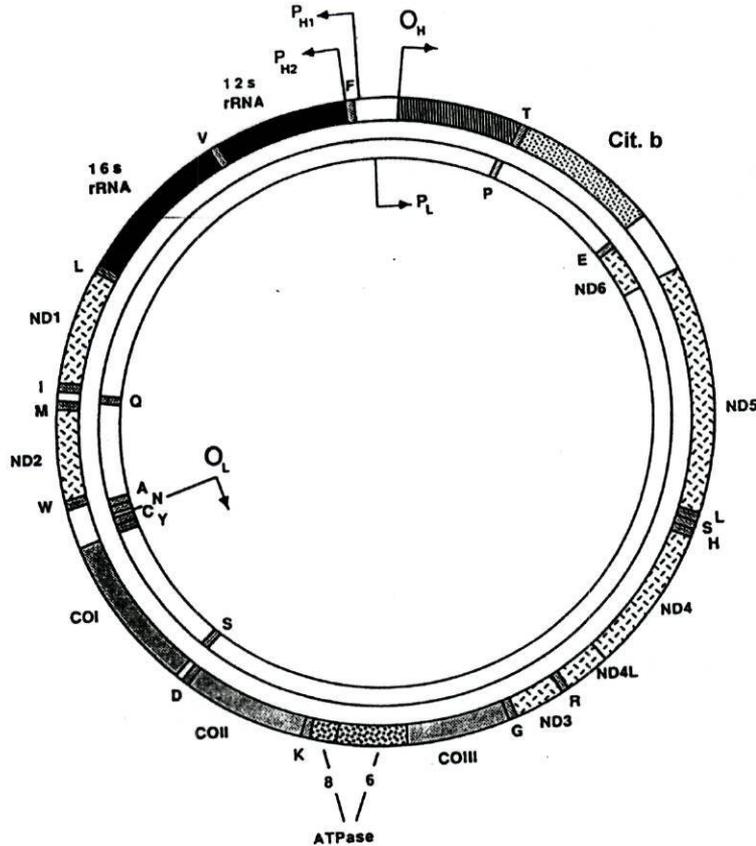
Os genes dos tRNAs estão localizados estrategicamente entre os dos rRNAs e os genes estruturais e desempenham um papel importante na correcta transcrição dos tRNAs, rRNAs e mRNAs. Os tRNAs e os rRNAs codificados pelo mtDNA são utilizados exclusivamente para a síntese das proteínas mitocondriais (Schon *et al*, 1997). Os genes nucleares codificam para as restantes subunidades da OXPHOS e para todas as outras proteínas mitocondriais. É de realçar que apenas uma diminuta percentagem das necessidades proteicas mitocondriais é satisfeita por este organelo. Noventa e cinco por cento das proteínas mitocondriais são codificadas por genes nucleares, produzidas como precursores nos polissomas citoplasmáticos, importadas para a mitocôndria e aí processadas e agrupadas nos compartimentos mitocondriais adequados (Schon *et al*, 1997).

Os genomas mitocondriais dos diferentes organismos apresentam uma grande diversidade, sendo o genoma humano dos mais pequenos e um exemplo da economia genética. Esta informação genética tão compactada, desprovida de intrões, sugere que uma mutação possa facilmente atingir um gene codificante e originar uma doença mitocondrial. Na maior parte dos casos, os codões terminais não são codificados no DNA mas criados por poliadenilação dos mRNAs após transcrição.

O sistema OXPHOS utiliza os produtos de cerca de 60 genes nucleares (Smeitink *et al*, 1999) que são sintetizados nos ribossomas citoplasmáticos e depois importados para a mitocôndria, onde vão ser conjugados com as 13 subunidades codificadas pelo mtDNA nas respectivas holoenzimas para produzir o ATP celular (Munnich *et al*, 1992; Moraes *et al*, 1989).

O Complexo II (succinato-CoQ oxido-redutase) é formado exclusivamente por subunidades codificadas pelo nDNA. É por conseguinte, muitas vezes utilizado como “controlo interno” bioquímico ou histológico, para a presença, quantidade e viabilidade

A



B

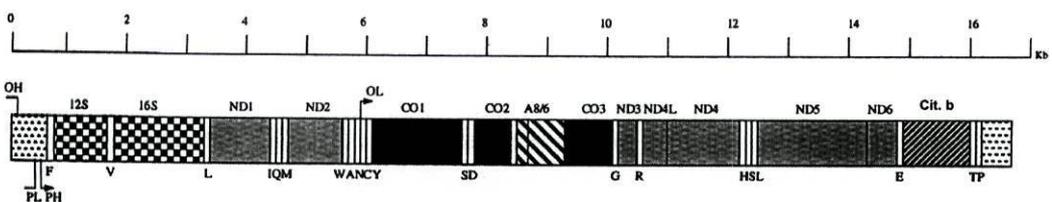


Figura I-5 Representação esquemática (A-circular e B-linear) do genoma mitocondrial humano, compreendendo os genes que codificam para: 2 RNAs ribossômicos (12S e 16S); 22RNAs de transferência (representados pela letra correspondente ao aminoácido que transportam, na nomenclatura internacional); 13 RNAs mensageiros correspondentes a polipeptídeos da cadeia respiratória mitocondrial sendo ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6; subunidades da NADH desidrogenase (complexo I); cit *b* (complexo III); COI, COII, COIII (complexo IV) e A6, A8 (complexo V). O círculo interior representa a cadeia leve (L) e o exterior a cadeia pesada (H).

Abreviaturas:  $O_H$  e  $O_L$  origens de replicação das cadeias pesada e leve (as setas indicam a direcção da duplicação ou transcrição).  $P_H$  e  $P_L$  são promotores da transcrição das cadeias pesada e leve (DiMauro *et al*, 1993).

das mitocôndrias nas situações onde mutações do mtDNA originam uma deficiência de um ou de vários complexos respiratórios.

As alterações do mtDNA podem ser hereditárias ou adquiridas, sendo estas últimas devidas a causas multifactoriais. As disfunções mitocondriais hereditárias podem ainda ser resultantes de mutações do nDNA (Zeviani *et Tiranti*, 1993).

### Replicação, transcrição e tradução do mtDNA

O mtDNA apresenta várias características peculiares, que discutiremos a seguir. A replicação e a transcrição do mtDNA têm propriedades muito diferentes das do nDNA (Clayton 1982; 1991; 1992). Há duas origens para a replicação: a da cadeia pesada ( $O_H$ ) e a da cadeia leve ( $O_L$ ). A  $O_H$  está localizada no D-loop. Para a transcrição existe somente uma região promotora localizada também na região do D-loop. Os promotores das cadeias pesadas e das cadeias leves ( $P_H$  e  $P_L$  respectivamente) iniciam a transcrição das respectivas cadeias de mtDNA simetricamente como grandes moléculas de RNA policistrónicas.

O código genético mitocondrial difere do código “universal” em quatro dos 64 tripletos, o que faz com que a tradução mitocondrial não seja possível pelo mesmo mecanismo da tradução citosólica (Quadro I-2).

Quadro I-2 Diferenças entre o código genético mitocondrial e nuclear

Codões	Tradução mitocondrial	Tradução citosólica
AGA e AGG	Codão- <i>terminação</i>	Arginina
AUA	Metionina ( <i>iniciação</i> )	Isoleucina
UGA	Triptofano	Codão- <i>terminação</i>

Abreviaturas: A-adenina; G-guanina; U-uracilo.

A informação no mtDNA está muito compactada, porque não contém intrões, havendo mesmo a possibilidade de sobreposição de dois genes (ATPases 6 e 8) (Kroon *et al*, 1987). As sequências codificantes da maior parte dos genes (93%) são contíguas ou separadas por uma ou duas bases e em muitos casos os codões de terminação não estão codificados no mtDNA, sendo criados pós-transcricionalmente por poliadenilação do mRNA (Anderson *et al*, 1981). Os genes dos tRNAs estão localizados estrategicamente na cadeia de DNA de tal forma que ficam todos (à excepção de um) intercalados entre os genes dos rRNA e dos mRNAs. Estes percursores de RNAs são

então clivados por nucleases endógenas precisamente nos terminais 5' e 3' dos tRNAs, libertando-se deste modo os tRNAs activos e os respectivos rRNAs e mRNAs situados lateralmente.

A tradução dos mRNAs processa-se nos ribossomas mitocondriais (que contêm os rRNAs 12S e 16S). Se a transcrição for toda policistrónica, cada rRNA poderá ser sintetizado em quantidades equimolares à quantidade de mRNA. Contudo, a mitocôndria precisa de sintetizar rRNA suficiente para satisfazer as necessidades dos 13 mRNAs de uma só vez, pelo que, a transcrição do P<sub>H</sub> (que codifica os rRNAs) processa-se de duas formas: adicionalmente à síntese policistrónica da cadeia pesada há a síntese de um pequeno fragmento que se estende do P<sub>H</sub> até à parte final do gene do rRNA 16S. Esta pequena transcrição processa-se de uma forma 25 vezes mais rápida do que a da cadeia completa, dispondo-se assim, de quantidades adequadas de rRNAs 12S e 16S para a síntese proteica. É importante realçar que a transcrição desta porção de RNA policistrónico é finalizada já dentro do gene do tRNA da leucina [tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>]. Uma proteína específica “terminação” liga-se a uma região do DNA dentro do gene do tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> para bloquear a acção da RNA polimerase, que faz com que esta se desligue do DNA e conseqüentemente a transcrição termine. Quando a proteína *terminação* não se liga, a polimerase pode continuar no DNA e permitir a síntese da cadeia completa. Este mecanismo de terminar a transcrição tem sido utilizado, embora ainda não tenha sido confirmado, para explicar a patogénese do síndrome encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e acidentes vasculares cerebrais (MELAS) (Chomyn *et al*, 2000).

A percentagem de mutações espontâneas no mtDNA é superior à do nDNA e muitas mutações não patogénicas “neutras”, podem perpetuar-se através da sua replicação nas gerações celulares posteriores, contribuindo para a grande diversidade do mtDNA observada entre grupos étnicos e entre indivíduos. Esta diversidade tem-se revelado útil nas investigações antropológicas, etnológicas e forenses e é a base da popularizada mas ainda controversa hipótese da “Eva mitocondrial” que sugere que toda a população derivou de um ancestral feminino que terá vivido na África de leste há cerca de 200.000 anos (Cann *et al*, 1987).

#### 1.4. Caracterização da genética mitocondrial

Desde que Garrod e Bateson aplicaram pela primeira vez as leis de Mendel aos

erros inatos do metabolismo, têm sido observadas algumas exceções. A análise minuciosa de algumas doenças raras e o seu estudo a nível molecular, mostraram que na genética humana ocorrem exceções à hereditariedade mendeliana que devemos ter em consideração na genética médica. Podemos considerar que há quatro mecanismos não clássicos que podem afectar a transmissão ou expressão de distúrbios monogénicos: mosaicismo, impressão genómica (*imprinting*), dissomia uniparental e hereditariedade mitocondrial.

A genética mitocondrial é uma genética não mendeliana que assenta nos seguintes conceitos: hereditariedade materna, poliplasmia, heteroplasmia, limiar de expressão e segregação mitótica. Estas características particulares estão na base da extrema diversidade fenotípica das doenças associadas a mutações no mtDNA (Figura I-6).

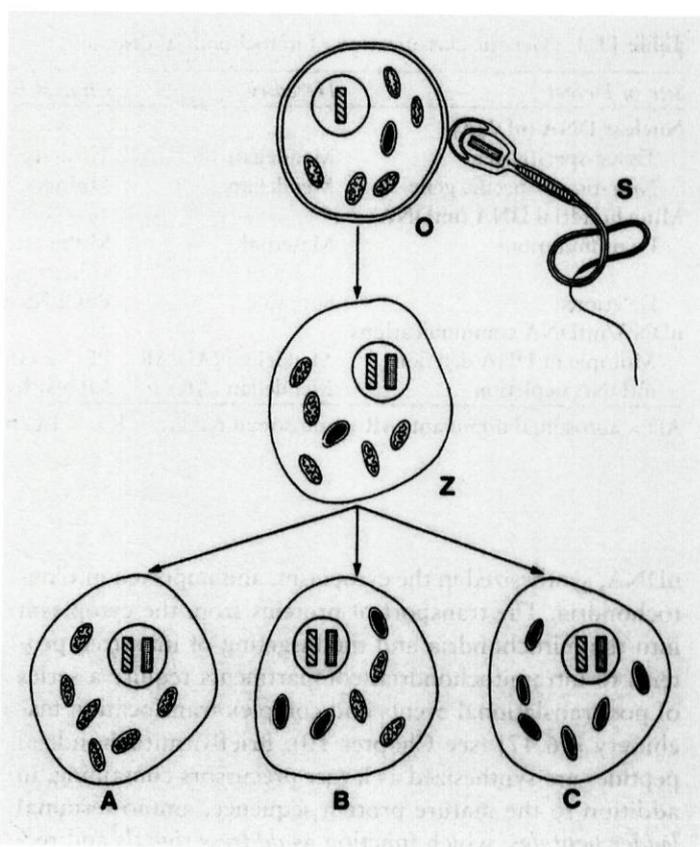


Figura I-6 Esquema que representa a hereditariedade materna dos genomas mitocondriais e a distribuição aleatória dos genomas mutados e não mutados pelas células filhas do zigoto (reproduzido de DiMauro *et al*, 1993). Abreviaturas: o – óvulo; s – espermatozóide; z – zigoto; A, B, C, células filhas.

### ***Hereditariedade materna***

As mitocôndrias e o mtDNA são transmitidos exclusivamente pela mãe à sua descendência (Giles *et al*, 1980), uma vez que o zigoto só possui mitocôndrias provenientes do ovócito (onde existem cerca de 100.000 mitocôndrias). Contudo, somente 1% das mitocôndrias presentes na fertilização irão fazer parte do embrião. Assim, a maioria das alterações patogénicas no mtDNA tem associada uma hereditariedade materna: as mães transmitem a deficiência aos filhos e filhas, mas apenas as filhas transmitirão a doença aos seus descendentes. Embora os espermatozóides contenham mitocôndrias, não tem sido demonstrada a presença de mtDNA de origem paterna no zigoto humano ou na sua descendência (Manfredi *et al*, 1996).

### ***Poliplasmia***

A poliplasmia é um conceito que explica porque razão a genética mitocondrial é a genética das populações e não segue as regras mendelianas (baseadas no facto dos genes nucleares possuírem dois alelos, um de origem materno e outro paterno). A maior parte das células contêm centenas ou milhares de mitocôndrias e cada mitocôndria possui múltiplas cópias dos mtDNAs, o que faz com que haja milhares de genomas mitocondriais em cada célula.

### ***Heteroplasmia***

Nos tecidos dos doentes podem coexistir moléculas de mtDNA normais e mutadas, originando diferentes genótipos mitocondriais. Esta situação é denominada heteroplasmia. Nos tecidos normais todos os DNAs são idênticos, denominando-se esta situação homoplasmia. Usualmente, os polimorfismos são homoplásmicos enquanto as mutações patogénicas são heteroplásmicas. A heteroplasmia é, por conseguinte, um critério geralmente aceite de patogenicidade de uma mutação nova.

Se a mutação está presente na linha germinativa feminina esta poderá ser transmitida às gerações seguintes.

### ***Segregação mitótica***

Num doente heteroplásmico, o fenótipo clínico pode variar de tecido para tecido, podendo mesmo modificar-se num determinado tecido com o envelhecimento, situação

esta devida à distribuição aleatória do mtDNA mutado pelas células filhas em cada divisão celular. Este aspecto dinâmico da transmissão mitocondrial é conhecido por segregação mitótica.

### ***Limiar de expressão.***

Atendendo ao elevado número de cópias de mtDNA em cada célula, a expressão fenotípica de uma mutação mitocondrial depende da proporção relativa entre os mtDNA normal e mutado dentro de cada célula, o que implica a existência de um limiar de expressão a partir do qual se manifesta um fenótipo diferente do normal. Este limiar está relacionado com a dependência do metabolismo oxidativo por parte desse tecido (Howell *et al*, 1983).

As mutações que aparecem no mtDNA podem ser alterações qualitativas (mutações pontuais, deleções e duplicações) e quantitativas (depleção). Está-se perante uma depleção quando há uma diminuição significativa da relação mtDNA/nDNA quando comparada com a obtida a partir do DNA total isolado do mesmo tecido de um indivíduo normal.

## **2. Classificação das citopatias mitocondriais**

As citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças que se caracterizam por uma disfunção mitocondrial. A grande variabilidade na expressão clínica deste tipo de patologias deve-se não só, às importantes funções metabólicas que a mitocôndria desempenha na vida celular, mas também à quantidade de mitocôndrias presente nos diversos tecidos e à particular relação mitocôndria/núcleo.

As citopatias mitocondriais podem ser classificadas bioquimicamente em cinco grupos de acordo com a área do metabolismo mitocondrial afectado (Quadro I-3).

As doenças incluídas nos quatro primeiros grupos são de transmissão mendeliana, dado que todas as enzimas envolvidas são codificadas por genes nucleares. Estas patologias têm características bioquímicas típicas da maioria dos erros inatos do metabolismo, nas quais a deficiência na enzima em causa é praticamente completa. O quinto grupo, os défices da cadeia respiratória é o mais complexo, dado que a CRM é codificada pelos dois genomas, nuclear e mitocondrial. É também, o mais importante

em termos de impacto na saúde pública, porque comparativamente aos grupos anteriores inclui um grande número de doentes.

#### Quadro I-3 Classificação bioquímica das doenças mitocondriais\*

1. **Defeitos no transporte do substrato**
  - Défice de carnitina palmitoil-transferase
  - Défice de carnitina
  - Défice de carnitina-acilcarnitina translocase
2. **Defeitos na utilização do substrato**
  - Défice do complexo piruvato desidrogenase
  - Défice da piruvato carboxilase
  - Défices da  $\beta$ -oxidação mitocondrial dos ácidos gordos
3. **Defeitos do ciclo de Krebs**
  - Défice em fumarase
  - Défice de  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase
4. **Defeitos da ligação oxidação-fosforilação**
  - Síndrome de Luft
5. **Defeitos da cadeia respiratória e ATP sintetase**
  - Défice do complexo I
  - Défice do complexo II
  - Défice do complexo III
  - Défice do complexo IV
  - Défice do complexo V
  - Défices combinados dos complexos da cadeia respiratória.

\*Classificação de acordo com DiMauro *et al*, 1999.

### 2.1. Perspectiva histórica da OXPHOS

Pode dizer-se que a história das doenças mitocondriais teve o seu início em 1962, quando Luft *et al*, descreveram a primeira doença humana provocada por uma deficiência mitocondrial numa jovem doente sueca que sofria de hipermetabolismo não tiroideu. Quando o músculo foi estudado num manómetro de Warburg, as mitocôndrias tinham uma capacidade praticamente normal de fosforilar o ADP a ATP, mas continuavam a fixar O<sub>2</sub> quase à velocidade máxima mesmo na ausência de ADP, tendo os estudos bioquímicos subsequentemente revelado uma diminuição acentuada do controlo respiratório mitocondrial.

No ano seguinte, Engel *et Cunningham* introduziram uma modificação à técnica de Gomori que permitia a identificação de depósitos anormais de mitocôndrias, as chamadas RRFs. Nesse mesmo ano, Nass *et Nass* demonstraram que as mitocôndrias continham

pequenas moléculas circulares de DNA, os seus próprios genomas. Este DNA estava presente em milhares de cópias por célula e era transmitido exclusivamente pela mãe.

Nos anos 70, os cientistas clínicos direccionaram os seus estudos para as doenças neuromusculares e principalmente para a morfologia muscular. A investigação ultraestrutural sistemática das amostras de biópsias de músculo (Shy *et al*, 1964, 1966) levaram ao reconhecimento de diferentes tipos de alterações mitocondriais que se pensavam caracterizar doenças distintas como proliferação de mitocôndrias aparentemente normais (miopatia pleoconial) ou mitocôndrias de volume aumentado com cristas desorganizadas (miopatia megaconial).

Em 1981, a sequência completa do genoma mitocondrial foi demonstrada por Anderson *et al*, tendo sido recentemente revista (Andrews *et al*, 1999).

De 1962 até 1988, as doenças mitocondriais foram classificadas com base nos dados histológicos dos tecidos afectados e nas determinações bioquímicas das actividades enzimáticas mitocondriais musculares.

Em 1988, Holt *et al*, detectaram pela primeira vez uma mutação (deleção) no mtDNA, o que muito contribuiu para o avanço na investigação da genética mitocondrial. Nesse mesmo ano, Wallace *et al*<sup>a</sup>, publicaram as primeiras mutações pontuais no mtDNA, associadas à neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON). Desde 1990, foram descritas mais de 50 de mutações patogénicas e alterações quantitativas do mtDNA (depleção do mtDNA) em diferentes fenótipos, associadas a alterações da OXPHOS, (Quadro I-4).

Nasceu assim, um novo capítulo na genética humana e em 1993 foi inteiramente dedicado um livro ao papel do mtDNA na patologia humana (DiMauro et Wallace, 1993).

## 2.2. Bioquímica da OXPHOS

As citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças com diferentes tipos de hereditariedade associada, que se caracterizam por alterações do funcionamento da mitocôndria. As disfunções da CRM, que podem ser causadas por alterações do mtDNA, provocam uma modificação no estado de oxido-redução celular (Jeong-yu *et al*, 1996) que se reflecte num aumento de lactato e corpos cetónicos plasmáticos (Adams *et al*, 1996). Estas alterações tornam-se particularmente evidentes após esforço ou sobrecarga de glicose (Poggi-Travert *et al*, 1996).

Quadro I-4 Mutações pontuais patogênicas do mtDNA

Nucleótido	Mutação	Localização do gene	Fenótipo	Referência
583	G→A	tRNA-Phe	MELAS	Hanna <i>et al</i> , 1998
618	T→C	tRNA-Phe	Miopatia	Kleinle <i>et al</i> , 1998
1555	A→G	12s rRNA	Surdez-induzida aminoglicosídeos	Prezant <i>et al</i> , 1993
1642	G→A	tRNA-Val	MELAS	Taylor <i>et al</i> , 1996
1644	G→T	tRNA-Val	MILS	Chalmers <i>et al</i> , 1997
3243	A→G	tRNA-Leu(UUR)	MELAS/PEO/diabetes/perda auditiva	Goto <i>et al</i> , 1990 <sup>a</sup>
3250	T→C	tRNA-Leu(UUR)	Miopatia	Goto <i>et al</i> , 1992
3251	A→G	tRNA-Leu(UUR)	Multissistêmico	Sweeney <i>et al</i> , 1993
3252	A→G	tRNA-Leu(UUR)	Multissistêmico	Morten <i>et al</i> , 1993
3254	C→G	tRNA-Leu(UUR)	MICM	Kawari <i>et al</i> , 1997
3256	C→T	tRNA-Leu(UUR)	Multissistêmico/PEO/MELAS	Moraes <i>et al</i> , 1993 <sup>d</sup>
3260	A→G	tRNA-Leu(UUR)	MICM/miopatia	Zeviani <i>et al</i> , 1991
3271	T→C	tRNA-Leu(UUR)	MELAS	Goto <i>et al</i> , 1991
3271	Del T	tRNA-Leu(UUR)	MELAS	Shoffner <i>et al</i> , 1995
3291	T→C	tRNA-Leu(UUR)	MELAS	Goto <i>et al</i> , 1994
3302	A→G	tRNA-Leu(UUR)	Miopatia	Bindoff <i>et al</i> , 1993
3303	C→T	tRNA-Leu(UUR)	MICM	Silvestri <i>et al</i> , 1994
3394	T→C	ND1	LHON	Brown <i>et al</i> , 1992 <sup>b</sup>
3460	G→A	ND1	LHON	Huoponen <i>et al</i> , 1991
4160	T→C	ND1	LHON	Howell <i>et al</i> 1991
4216	T→C	ND1	LHON	Mackey <i>et al</i> , 1992
4269	A→G	tRNA-Ile	MICM/multissistêmico	Taniike <i>et al</i> , 1992
4274	T→C	tRNA-Ile	PEO	Chinnery <i>et al</i> , 1997
4285	T→C	tRNA-Ile	PEO	Silvestri <i>et al</i> , 1996
4295	A→G	tRNA-Ile	Cardiomiopatia hipertrófica	Merante <i>et al</i> , 1996
4298	G→A	tRNA-Ile	PEO/esclerose múltipla	Taylor <i>et al</i> , 1998
4300	A→G	tRNA-Ile	MICM	Casali <i>et al</i> , 1995
4309	G→A	tRNA-Ile	PEO	Franceschina <i>et al</i> , 1998
4320	A→G	tRNA-Ile	Cardiomiopatia multissistemática	Santorelli <i>et al</i> , 1995
4409	T→C	tRNA-Met	Intolerância ao exercício	Vissing <i>et al</i> , 1998
4917	A→G	ND2	LHON	Johns <i>et al</i> , 1991 <sup>b</sup>
5244	G→A	ND2	LHON	Brown <i>et al</i> , 1992 <sup>b</sup>
5549	G→A	tRNA-Trp	Coreia, demência	Nelson <i>et al</i> , 1995
5521	G→A	tRNA-Trp	Miopatia	Silvestri <i>et al</i> , 1998
5692	T→C	tRNA-Asn	PEO	Seibel <i>et al</i> , 1994
5703	C→T	tRNA-Asn	PEO	Moraes <i>et al</i> , 1993 <sup>d</sup>
5814	T→C	tRNA-Cys	MELAS-like	Manfredi <i>et al</i> , 1996
7444	G→A	COX I	LHON	Brown <i>et al</i> , 1992 <sup>c</sup>
7445	T→C	tRNA-Ser(UCN)	Surdez	Reid <i>et al</i> , 1994
7472	Ins C	tRNA-Ser(UCN)	Surdez, ataxia, mioclonias	Tiranti <i>et al</i> , 1995
7512	T→C	tRNA-Ser(UCN)	MERRF/MELAS	Nakamura <i>et al</i> , 1995
7543	G→A	tRNA-Asp	Encefalopatia	Shtilbans <i>et al</i> , 1999
8328	G→A	tRNA-Lys	Encefalomiopatia	Houshmand <i>et al</i> , 1999
8344	A→G	tRNA-Lys	MERRF	Shoffner <i>et al</i> , 1990
8356	T→C	tRNA-Lys	MERRF/MELAS	Hammans <i>et al</i> , 1991
8363	G→A	tRNA-Lys	MICM/PEO/ataxia/surdez	Ozawa <i>et al</i> , 1995
8851	T→C	ATPase 6	Necrose bilateral do estriado	DeMeirleir <i>et al</i> , 1994
8993	T→G	ATPase 6	NARP/MILS	Holt <i>et al</i> , 1990
8993	T→C	ATPase 6	NARP/MILS	deVries <i>et al</i> , 1993
9101	T→C	ATPase 6	LHON	Lamminen <i>et al</i> , 1995
9176	T→C	ATPase 6	Necrose bilateral do estriado	Thyagarajan <i>et al</i> , 1995

9438	G→A	COX III	LHON	Johns <i>et al</i> , 1994
9804	G→A	COX III	LHON	Johns <i>et al</i> , 1994
9957	T→C	COX III	MELAS	Manfredi <i>et al</i> , 1995
9997	T→C	tRNA-Gly	MICM	Merante <i>et al</i> , 1994
10044	A→G	tRNA-Gly	LHON	Santorelli <i>et al</i> , 1996 <sup>c</sup>
11778	G→A	ND4	LHON	Wallace <i>et al</i> , 1988 <sup>a</sup>
12311	T→C	tRNA-Leu(CUN)	PEO	Hattori <i>et al</i> , 1994
12315	G→A	tRNA-Leu (CUN)	Encefalomiopatia	Fu <i>et al</i> , 1996
12320	A→G	tRNA-Leu (CUN)	Miopatia	Weber <i>et al</i> , 1997
13513	G→A	ND5	MELAS	Santorelli <i>et al</i> , 1997 <sup>b</sup>
13708	G→A	ND5	LHON	Johns <i>et al</i> , 1991 <sup>b</sup>
14459	G→A	ND6	LHON/distonia	Jun <i>et al</i> , 1994
14484	T→C	ND6	LHON	Johns <i>et al</i> , 1992 <sup>a</sup>
14709	T→C	ND6	Miopatia/diabetes	Hao <i>et al</i> , 1995
15257	G→A	Cit b	LHON	Johns <i>et al</i> , 1991 <sup>b</sup>
15723	G→A	Cit b	Miopatia	Andreu <i>et al</i> , 1999
15812	G→A	Cit b	LHON	Johns <i>et al</i> , 1991 <sup>b</sup>
15923	A→G	tRNA-Thr	Deficiência respiratória infantil	Yoon <i>et al</i> , 1993
15990	C→T	tRNA-Pro	Miopatia	Moraes <i>et al</i> , 1993 <sup>f</sup>

(Servidei, 1999); MICM miopatia e cardiomiopatia.

### A. Exames laboratoriais

O lactato e o piruvato são parâmetros sanguíneos fisiológicos e os seus níveis plasmáticos reflectem o equilíbrio entre a sua produção citoplasmática e o seu consumo pelos diferentes tecidos.

A produção citoplasmática de lactato ocorre principalmente na pele (30%), eritrócitos (30%), cérebro (16%) e músculo (16%) (Saudubray *et al*, 1994). A utilização de lactato ocorre no fígado durante o jejum, através da gluconeogénese (60 a 70%) e no coração, músculo e rim, como via secundária, através da oxidação mitocondrial.

As concentrações de ácido láctico dependem das concentrações de ácido pirúvico, do estado de oxido-redução da célula e ainda do funcionamento da cadeia transportadora de electrões que regenera NAD a partir de NADH<sub>2</sub> (Figura I-7).

Uma acumulação de lactato sanguíneo pode ser devida a um colapso circulatório, hipóxia ou a outras condições associadas a uma falência da respiração celular que devem ser excluídas antes de uma suspeita de um erro inato da oxidação lactato/piruvato. Outras causas adquiridas podem originar hiperlactacidemias secundárias persistentes tais como diarreias ou infecções crónicas, principalmente do tracto urinário, hiperventilação, falência hepática e muitas outras. Na maior parte das hiperlactacidemias secundárias, como é o caso da hipóxia tecidual, a cetose está ausente, enquanto que na maioria das hiperlactacidemias primárias é um dado importante, normalmente associado.

Por outro lado, o valor da lactacidemia não é discriminatório, pois algumas doenças adquiridas apresentam hiperlactacidemias graves, enquanto as doenças hereditárias do metabolismo lactato/piruvato revelam hiperlactacidemias moderadas.

O estado nutricional do indivíduo também pode provocar modificações dos níveis sanguíneos do lactato e piruvato.

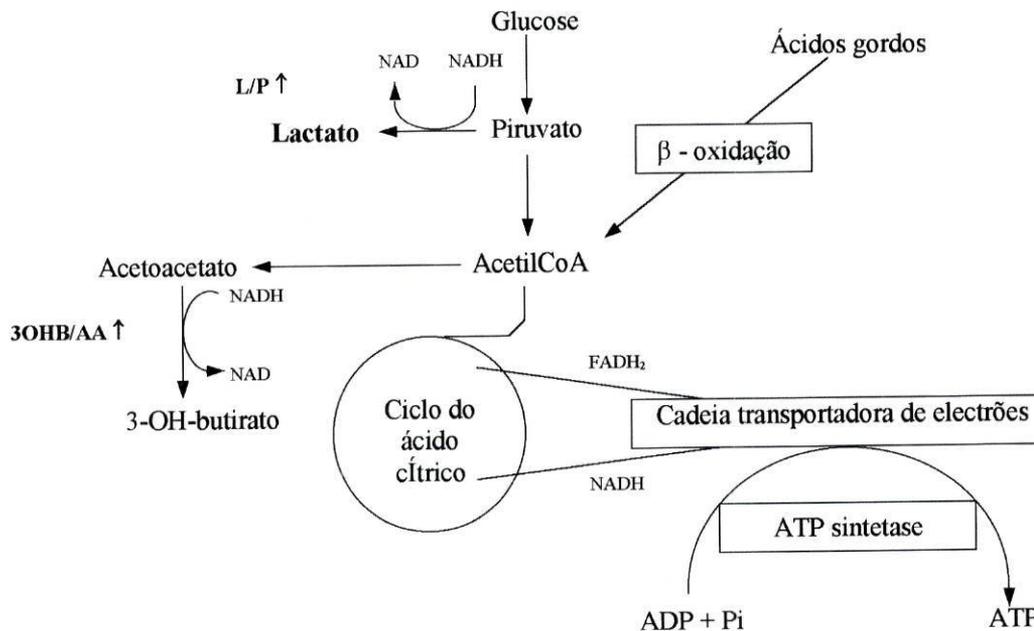


Figura I-7 Representação esquemática da produção de lactato, de 3-hidroxibutirato (3OHB) e ATP.

### Hiperlactacidemias devidas a erros inatos do metabolismo

Para além das acidúrias orgânicas, hiperamoniemias congénitas e alterações da β-oxidação dos ácidos gordos que originam uma hiperlactacidemia secundária, há quatro grupos de patologias que provocam uma hiperlactacidemia primária: glicogenoses e alterações da gliconeogénese hepática, alterações da oxidação piruvato/lactato, complexo piruvato desidrogenase (PDH) e os défices da cadeia respiratória mitocondrial.

O diagnóstico diferencial das hiperlactacidemias baseia-se em dados clínicos e critérios metabólicos.

Uma informação importante é a altura em que a hiperlactacidemia atinge um valor máximo. Nas glicogenoses tipo III e VI e no défice da sintetase do glicogénio, a

hiperlactacidemia só é detectada no período pós-prandial quando o doente ingere uma dieta rica em glúcidos. Os níveis de lactato são normais quando o doente está em jejum ou hipoglicémico (Fernandes *et al*, 1974; Aynsley-Green *et al*, 1977). Nestas patologias, a hiperlactacidemia raramente atinge um valor de 7 mmol/L.

Nos défices da gluconeogénese hepática (défice da fructose 1,6-difosfatase e glucose-6-fosfatase) a hiperlactacidemia que pode atingir 15 mmol/L é observada quando o doente está em jejum ou hipoglicémico.

A hiperlactacidemia é permanente no défice da piruvato carboxilase (PC), registando-se tanto em jejum, como no período pós-prandial (Wallace, 1992<sup>b</sup>). Nos défices do complexo piruvato desidrogenase (PDH), da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e da CRM, os níveis máximos de lactato são observados no período pós-prandial, embora as hiperlactacidemias superiores a 7 mmol/l possam ser mais ou menos persistentes. Nestas doenças, por vezes a hiperlactacidemia moderada (embora significativa) pode não ser valorizada quando a avaliação é efectuada após um jejum prolongado, como é habitual fazer para a maior parte das avaliações sanguíneas.

Outro dado importante é a determinação simultânea das relações lactato/piruvato (L/P) e dos corpos cetónicos 3-hidroxibutirato/acetoacetato (3OHB/AA) antes e após as refeições. Estas razões plasmáticas reflectem indirectamente os estados de oxido-redução citoplasmático (L/P) e mitocondrial (3OHB/AA). No défice da PC (isolado ou secundário a um défice em biotinidase ou da sintetase da holocarboxilase), a relação L/P é muito alta e é associada com uma hiperlactacidemia que aumenta no pós-prandial, e uma razão 3OHB/AA normal ou baixa (Robinson *et al*, 1987; Saudubray *et al*, 1976).

No défice da PDH deve efectuar-se o estudo do lactato sanguíneo após prova de sobrecarga de fructose (Stansbie *et al*, 1978). Para testar a activação da PDH pode também efectuar-se a prova de sobrecarga com dicloroacetato (Coudé *et al*, 1978) ou com 2-cloropropionato.

Podemos considerar praticamente patognomónicos dos erros inatos do metabolismo do lactato/piruvato os três perfis metabólicos seguintes (Quadro I-5):

1. Quando a razão L/P é normal ou baixa (<10) sem hiperketonémia, a deficiência da PDH é altamente provável apesar de a lactacidemia poder estar só moderadamente elevada após a refeição;

- Quando a razão L/P é muito alta (>30) associada a hipercetonémia pós-prandial, com uma razão normal baixa de 3OHB/AA (<1,5), o déficit de PC ou da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase são os diagnósticos mais prováveis.
- Quando as razões L/P e 3OHB/AA estão elevadas e associadas a hipercetonémia pós-prandial significativa são suspeitas de deficiência da CRM.

Quadro I-5. Diagnóstico diferencial das hiperlactacidemias hereditárias

	Glicogenoses			Gluconeogénese			Oxidação do piruvato		
	GliSi	III	VI	G6P	FDP	PDH	Krebs	PC	CR
Hiperlactacidemia que aumenta com o jejum	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Hiperlactacidemia que aumenta com a refeição	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Hipoglicemia em jejum	++	+	+/-	++	++	-	-	+	-
L/P	N	N	N	N	N	10	N	30	30
Cetose	++	++	+	+/-	+	-	+/-	++	+
3OHB/AA	N	N	N	N	N	N	1	1	3
Sinais clínicos associados	Hepat	Hepat	Hepat	Hepat	Hepat	Neur	Neur	Neur	Neur Mio

Legenda: L (lactato); P (piruvato); 3OHB (3-hidroxiacetato); AA (acetoacetato); GliSi (glicogénio sintetase); G6P (glucose 6-fosfatase); FDP (fructose 1,6-difosfatase); PDH (piruvato desidrogenase); PC (piruvato carboxilase); CR (cadeia respiratória); N (normal); + (presente); - (ausente); Hepat (hepatomegalia); Neur (neuroológicos); Mio (musculares) (adaptado de Bonnefont *et al*, 1991).

Em todas as outras situações, especialmente quando a razão L/P é alta sem hipercetonémia associada, as doenças da CRM são equacionadas após terem sido excluídas todas as causas de anóxia. Nestes casos e se a lactacidémia oscila entre 2 e 3 mmol/L, a determinação do lactato no LCR deve ser efectuada (no caso de apresentação neurológica) e a respectiva razão L/P, após teste de sobrecarga de glucose e/ou teste de esforço (no caso de apresentação muscular ou sistémica). Estes testes são desnecessários quando o lactato basal seja superior a 7 mmol/L.

Atendendo a que a CRM transfere  $\text{NADH}_2$  até  $\text{O}_2$ , uma doença da OXPHOS originará um aumento dos cofactores reduzidos na mitocôndria e no citoplasma, e uma disfunção do ciclo de Krebs, devido a um excesso de  $\text{NADH}_2$  e falta de NAD. Consequentemente haverá um aumento de corpos cetónicos e hiperlactacidemia assim como das razões 3OHB/AA e L/P.

A síntese dos corpos cetónicos aumenta após as refeições devido à canalização

da acetilCoA para a cetogénese (Saudubray *et al*, 1992). A elevação dos corpos cetónicos totais no período pós-prandial é paradoxal (hipercetonémia paradoxal), pois normalmente diminuem após as refeições devido à libertação de insulina. Por esta razão, nos doentes suspeitos de défices da CRM, na investigação preliminar incluímos a determinação de lactato, piruvato, corpos cetónicos e respectivas razões molares em jejum e 1h pós-prandial, que podem ser repetidas ao longo do dia.

#### **B. Provas funcionais de avaliação de lactato e do metabolismo oxidativo em diferentes líquidos fisiológicos**

Quando os testes de avaliação basal são inconclusivos dever-se-à:

- 1- Efectuar um teste de sobrecarga de glucose (2gr/Kg *per os*) para evidenciar uma hiperlactacidemia latente e/ou hipercetonémia paradoxal.
- 2- Determinar o lactato urinário e pesquisar os intermediários do ciclo de Krebs usando a metodologia de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS).
- 3- Determinar o estado de oxidação-redução no LCR.

A interpretação dos resultados obtidos tem que ser feita tendo em consideração as seguintes situações:

1. Tubulopatia proximal que pode levar a uma diminuição do lactato sanguíneo e a um aumento do lactato urinário.
2. Diabetes mellitus que pode dificultar a entrada de piruvato no ciclo do ácido cítrico.
3. Isoformas específicas de tecidos que podem estar selectivamente deficitárias, alterando ligeiramente o estado de redox do plasma (particularmente nas cardiomiopatias hipertróficas)
4. O defeito pode ser generalizado embora parcial e a maior parte dos tecidos de alta dependência do metabolismo oxidativo (como o cérebro e o músculo) sofrem com qualquer perturbação do estado de oxido-redução plasmático.
5. O defeito pode ser restrito ao complexo II, afectando ligeiramente (em princípio) o estado redox do plasma.

### Prova de esforço físico

Através de provas de esforço físico padronizadas, utilizando ergômetros cíclicos, podem ser detectadas as alterações do metabolismo oxidativo que é a maior fonte de energia para a contração muscular (Haller *et al*, 1989). O máximo de *uptake* do oxigénio ( $VO_{2max}$ ) é o melhor indicador para avaliar o metabolismo oxidativo do doente. O  $VO_{2max}$  é a diferença entre o débito cardíaco máximo e o oxigénio sistémico arteriovenoso máximo (traduzirá a capacidade do músculo em obter oxigénio). Nos doentes com alterações da OXPHOS (Haller *et al*, 1989; 1991) as respostas típicas são:

1. O aumento do débito cardíaco durante o exercício é maior que o normal relativamente ao rendimento do metabolismo oxidativo.
2. A obtenção de oxigénio por unidade de sangue permanece inalterável quando comparamos o estado de repouso e o máximo de exercício, contrariamente ao aumento de cerca de três vezes verificado nos indivíduos normais. Há, por conseguinte, um desfasamento entre a quantidade de oxigénio transportada e a sua utilização.
3. A ventilação é normal em repouso mas aumenta excessivamente relativamente à *captação* do oxigénio. A hiperpneia durante o exercício é superior ao normal relativamente ao aumento da produção metabólica.
4. Em repouso, há uma hiperlactacidémia moderada que aumenta excessivamente após o esforço e o nível de captação do oxigénio.

Este tipo de teste não é exequível em crianças devido à falta de colaboração por parte destas, sendo exclusivamente reservado aos adultos.

### Espectroscopia de infravermelhos

A espectroscopia de infravermelhos é uma técnica óptica não invasiva que permite avaliar o grau de desoxigenação da hemoglobina durante o exercício nos doentes com disfunção mitocondrial (Bank *et al*, 1994, 1998).

### $^{31}P$ RMN muscular

Outra forma de estudar as alterações do metabolismo energético muscular é através da espectroscopia da ressonância magnética nuclear ( $^{31}P$  RMN), que avalia a razão entre a fosfocreatina (PCr) e o fósforo inorgânico (Pi) do músculo em repouso, durante o exercício e durante a recuperação do exercício. Nos indivíduos normais não

há alterações significativas, enquanto que os doentes com miopatias mitocondriais registam as seguintes alterações (Argov *et al*, 1991; Taylor *et al*, 1994):

- 1) Em repouso, as razões entre PCr/Pi e PCr/ATP são menores do que o normal.
- 2) Durante o exercício, a razão entre PCr/Pi diminui mais que o normal mesmo quando realizam menos esforço que o normal.
- 3) Após exercício, a recuperação das razões PCr/Pi e PCr/ADP é mais lenta do que o normal.

Este estudo é provavelmente o indicador mais sensível de disfunção mitocondrial.

### **Espectroscopia da ressonância magnética nuclear cerebral**

Na avaliação das encefalopatias mitocondriais, para além da tomografia computadorizada (TAC) e da ressonância magnética nuclear (RMN) cerebral, a espectroscopia da ressonância magnética protónica pode fornecer informações relativamente aos níveis e localização de metabolitos cerebrais tais como o ácido N-acetil aspártico, creatina e fosfocreatina, compostos que contêm colina e lactato (Cross *et al*, 1993).

### **C. Estudos espectrofométricos e polarográficos da OXPHOS**

A observação de um estado de oxido-redução plasmático anormal ou a de um atingimento multissistémico, sugerem outros tipos de investigações: estudos espectrofométricos e enzimáticos e eventualmente, estudos polarográficos da OXPHOS. Os estudos espectrofométricos consistem na determinação da actividade enzimática dos complexos da CRM quer individualmente quer por grupos, usando dadores e aceitadores de electrões específicos. Dado que não é necessário isolar as mitocôndrias para este estudo, a quantidade de material biológico exigido é menor (30-50mg). É, no entanto, indispensável que as amostras após a colheita sejam imediatamente congeladas a menos 80°C ou mantidas em azoto líquido até serem analisadas.

Os estudos polarográficos permitem medir o consumo de oxigénio em fracções tecidulares (cerca de 500mg) ricas em mitocôndrias, utilizando um eléctrodo de Clark (Estabrook *et al*, 1967), em presença de diferentes substratos oxidativos (malato e piruvato, malato e glutamato, succinato, palmitato). Estes estudos polarográficos

detectam não só as doenças da OXPHOS mas também deficiências da PDH, ciclo de Krebs e todas as situações em que existe uma diminuição dos equivalentes reduzidos na mitocôndria (Munnich *et al*, 1996). A miniaturização destas técnicas permite obter preparações enriquecidas em mitocôndrias a partir de pequenas biópsias musculares (100-200 mg de músculo biopsado sob anestesia local) (Rustin *et al*, 1994). É igualmente possível efectuar este tipo de estudo sobre linfócitos circulantes ou sobre células em cultura (linha linfoblastóide, fibroblastos) permeabilizadas por um detergente (Bourgeron *et al*, 1992).

Estes estudos só podem ser efectuados sobre material fresco.

#### **D. Tecidos a estudar**

*À priori*, o tecido a estudar deverá ser o clinicamente atingido. Assim, perante uma miopatia faz-se uma biópsia de músculo, perante uma hepatopatia uma biópsia de fígado, aquando de uma pancitopenia estudaríamos os linfócitos e assim por diante. É, porém, de realçar que os défices da CRM têm frequentemente uma apresentação multivisceral, particularmente nas crianças (Munnich *et al*, 1992).

Se, no entanto, os órgãos atingidos são de difícil acesso (cérebro, retina, sistema endócrino), as investigações recorrem aos tecidos periféricos (músculo, linfócitos e fibroblastos).

Sob o ponto de vista morfológico e bioquímico o músculo constitui o tecido ideal para se proceder ao estudo dos efeitos patogénicos das mutações existentes ao nível do mtDNA, devido ao seu elevado número de mitocôndrias, à sua maior facilidade de obtenção, e ao facto de várias alterações genéticas só serem detectáveis neste tecido pelo seu baixo poder de renovação.

#### **Estudo da CRM nos linfócitos circulantes**

Vários laboratórios utilizam os linfócitos circulantes para uma investigação preliminar do funcionamento da CRM. Nesse caso, procede-se ao isolamento de linfócitos a partir de 10mL de sangue heparinizado e efectua-se o estudo das actividades dos diferentes complexos da CRM.

### **2.3. Histologia associada a défice da OXPHOS**

O estudo histopatológico da biópsia de músculo, quando realizado com as

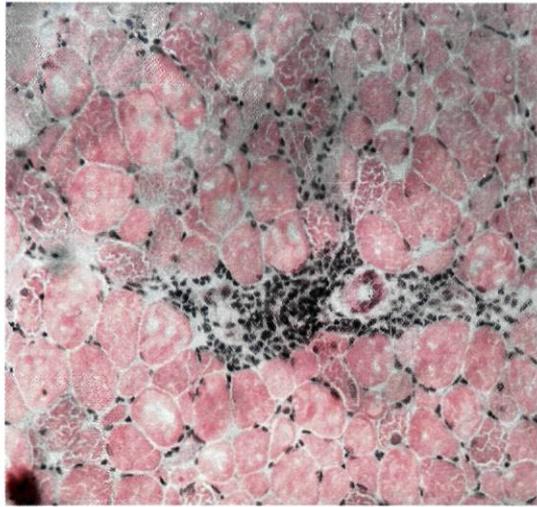
técnicas utilizadas por rotina na neuropatologia (fixação em soluto de formol e inclusão em parafina) não permite fazer o diagnóstico das doenças mitocondriais, dado que quase sempre o músculo apresenta morfologia normal ou evidencia alterações não específicas, nomeadamente a presença de fibras atrofiadas. Pelo contrário, o estudo de cortes de criostato de fragmentos congelados à temperatura do azoto líquido e a observação de cortes ultrafinos em microscopia electrónica permite identificar alterações mais específicas nas fibras musculares.

Nos cortes de criostato corados pela hematoxilina-eosina (H-E) é frequentemente possível localizar fibras musculares que apresentam áreas de sarcoplasma, geralmente subsarcolémicas, de coloração basófila. Quando coradas pelo método tricrómico de Gomori modificado (Engel *et* Cunningham, 1963) coram de vermelho, destacando-se da coloração verde normal do sarcoplasma e estando muitas vezes associadas a áreas vacuolizadas, quer subsarcolémicas, quer atravessando como fendas o sarcoplasma: são estas as típicas RRFs (Figura I-8).

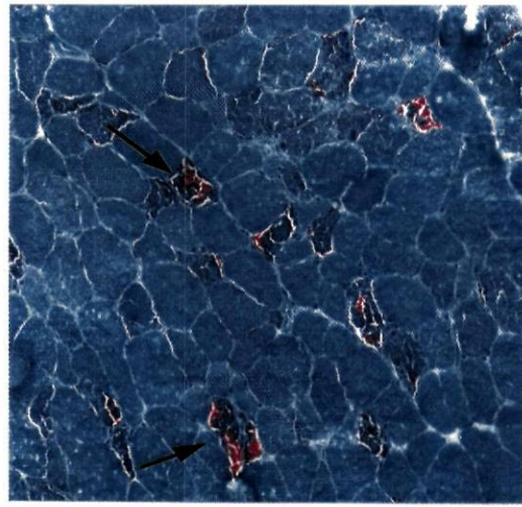
Noutros casos com lesões menos evidentes, estas áreas, de coloração basófila na H-E e vermelhas no tricrómico de Gomori modificado, são mais discretas, apenas de localização subsarcolémica, mas ocorrendo frequentemente nas fibras musculares. Estas alterações devem ser encaradas com prudência, dado que o mesmo aspecto pode corresponder a reorganização da estrutura das fibras, secundárias a outras patologias não mitocondriais de etiologia bem definida, como a distrofia de Duchenne, a distrofia muscular miotónica, a polimiosite, a dermatomiosite e algumas glicogenoses (DiMauro *et al*, 1992).

O estudo histoenzimático da desidrogenase succínica (SDH) dos cortes de criostato (Figura I-8), permite pôr em evidência a hiperactividade desta enzima mitocondrial nas mesmas áreas basófilas já referidas, provando que elas são devidas a grandes acumulações de mitocôndrias (DiMauro *et al*, 1993).

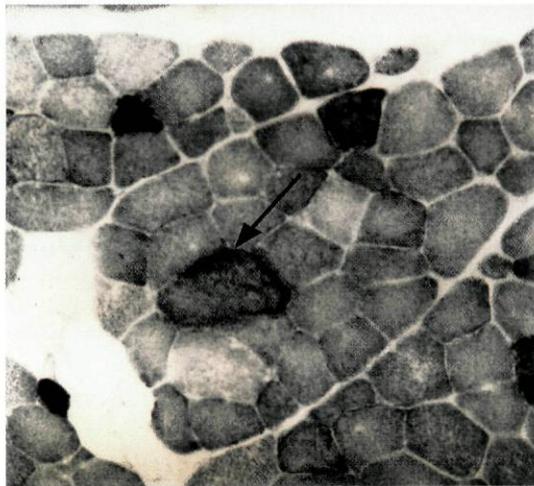
A técnica de evidenciação histoenzimática da citocromo *c* oxidase (COX), uma outra enzima mitocondrial, que cora de castanho escuro ou castanho alaranjado as fibras do tipo I (altamente oxidativas) e de castanho claro as fibras do tipo II (glicolíticas) permite verificar que, em grande parte das doenças mitocondriais, muitas das fibras (normalmente tipo I) são COX negativas (DiMauro *et* Bonilla, 1997).



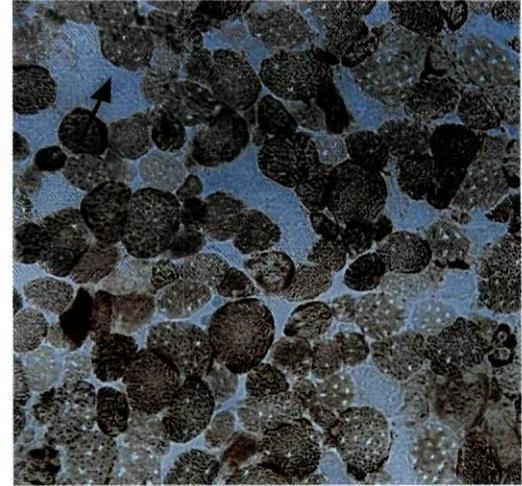
A



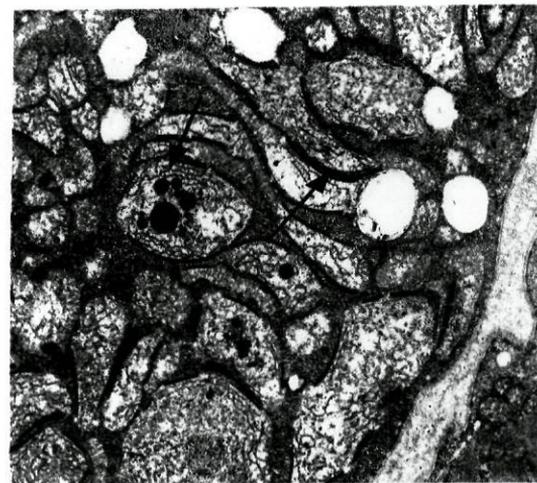
B



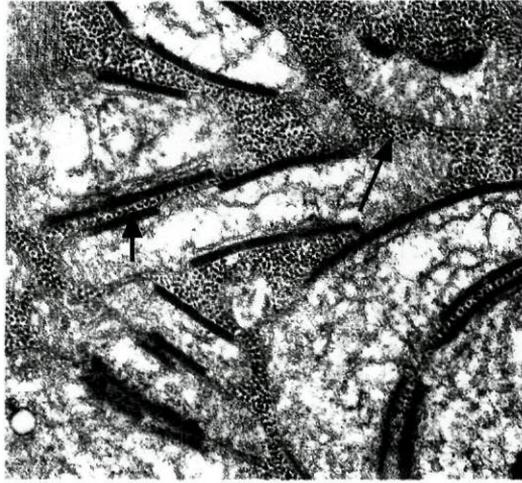
C



D



E



F

Figura I-8 Corte histológico transversal de músculo de dois doentes, corado com a hematoxilina-eosina (A), com o tricrómio de Gomori modificado (B), com a desidrogenase succínica (SDH) (C) e citocromo *c* oxidase (COX) (D) (x 215). Com a microscopia electrónica pode-se observar as inclusões paracristalinas e as electrodensas (E) (M.E. x 10.000), as gotículas lipídicas e os depósitos de glicogénio (E e F) (M.E. x 50.000 em F).

Uma coloração semelhante pode ser utilizada para evidenciar a actividade da ATPase mitocondrial (Rowland *et al*, 1983), embora não seja utilizada por rotina.

Inicialmente a microscopia electrónica teve um papel muito importante no reconhecimento e no diagnóstico deste tipo de doenças, permitindo observar as acumulações focais de mitocôndrias nas fibras e possibilitando a análise quer das suas dimensões quer da sua ultraestrutura. Nas mitocôndrias isoladas ou em grupos permitiu verificar que apresentavam por vezes formas anormais, grande volume e alterações da ultraestrutura da sua matriz (inclusões electrodensas, paracristalinas ou esféricas, cristas concêntricas e vacuolizações). Permitiu também observar que, associadas a estas acumulações de mitocôndrias, existiam entre elas aglomerados de grãos de glicogénio e gotículas lipídicas (Figura I-8).

Actualmente a microscopia electrónica é pouco utilizada no diagnóstico de rotina, estando reservada a casos problema.

Para além das técnicas histoenzimáticas, podem também ser usadas técnicas de imunohistoquímica para detecção de polipeptídeos específicos, como por exemplo subunidades da CRM codificadas pelo mtDNA, como ND1 ou COXII, ou pelo nDNA como a COXIV.

Em muitas condições de “stress metabólico” nomeadamente febre, hipóxia ou anóxia, acidose e toxémia, as mitocôndrias podem aumentar significativamente de volume e provocar a lise da célula.

### **3. Mutações associadas à OXPHOS**

As doenças mitocondriais constituem uma das áreas da medicina molecular mais investigadas nos últimos anos. A aplicação das técnicas de biologia molecular ao estudo genético destas doenças permitiu a caracterização de mais de 50 mutações pontuais e de uma centena de deleções e duplicações do mtDNA. Um vasto leque de apresentações clínicas, desde oftalmoplegias isoladas a encefalopatias graves, estão associadas a diferentes mutações.

### 3.1 Doenças associadas a mutações pontuais do mtDNA de transmissão materna

#### Neuropatia óptica hereditária de Leber

A neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) descrita pela primeira vez por Nikoskelainen em 1987, como doença de hereditariedade materna, é uma forma de cegueira por atrofia óptica, com início na segunda ou terceira décadas de vida, que afecta predominantemente o sexo masculino. A perda de visão começa pelo campo visual central de um dos olhos, extendendo-se ao outro semanas ou meses mais tarde. Alguns doentes conseguem recuperar a visão, facto que depende da mutação do mtDNA que lhe está associada, (Wallace *et al*, 1988; Norby, 1991; Moraes *et al*, 1993). Tanto os doentes como os portadores assintomáticos apresentam frequentemente telangiectasias peripapilares. Apesar de se tratar predominantemente de uma doença ocular, em alguns casos são detectáveis no músculo alterações cinéticas da actividade enzimática do complexo I CRM (Carelli *et al*, 1998). Estes doentes não apresentam nos estudos histológicos as típicas RRFs.

A LHON foi a primeira doença mitocondrial a ser caracterizada do ponto de vista molecular. Em 1988, Wallace e colaboradores, ao estudarem árvores genealógicas de LHON, descobriram a substituição de uma base guanina (G) por uma adenina (A) no codão 340 (nt-11778) do gene ND4 do complexo I, sendo esta considerada a mutação responsável pela doença. Desde então, têm sido encontradas outras mutações afectando genes que codificam polipeptídeos dos complexos I, III e IV da CRM. Algumas foram classificadas como mutações primárias: têm maior frequência e estão fortemente associadas ao fenótipo da LHON. O outro grupo compreende as mutações secundárias que poderão interactuar e agir sinergeticamente para produzir este fenótipo. Este modelo de mutações interactivas poderá ajudar a explicar alguma da variabilidade da expressão genética das doenças mitocondriais. Até ao momento, foram associadas a este fenótipo cerca de 17 mutações pontuais diferentes, sendo as G11778A, G3460A, T14484C e G15257A as mais frequentes e consideradas primárias.

A maior incidência de LHON nos indivíduos do sexo masculino é ainda uma questão controversa, podendo eventualmente ser atribuída a um *locus* no cromossoma X que interactua com o mtDNA mutado do LHON.

### **Epilepsia mioclónica com fibras rotas e vermelhas**

A epilepsia mioclónica com fibras rotas e vermelhas (MERRF) caracteriza-se por mioclonias, convulsões generalizadas, ataxia cerebelosa e miopatia mitocondrial com RRFs (Fukuhara *et al*, 1980; Hirano *et al*, 1996; DiMauro *et al*, 1997). Os primeiros sintomas surgem habitualmente na infância, mas também está descrito o seu aparecimento na idade adulta. Os doentes podem ter uma evolução lentamente progressiva ou rapidamente fatal. Outras apresentações clínicas incluem: demência, neuropatia, atrofia óptica, baixa estatura e perda de audição (Silvestri *et al*, 1993; Lombès *et al*, 1989; Ohtsuka *et al*, 1993). Quando presentes, os lipomas múltiplos são bastante característicos deste síndrome.

As histórias familiares são consistentes com hereditariedade materna, embora alguns dos membros com mutações do mtDNA associadas ao MERRF possam ser assintomáticos ou oligossintomáticos.

No estudo histológico da biópsia muscular encontram-se RRFs. Muitas das fibras musculares, incluindo as RRFs, são COX negativas.

Ao nível molecular, verifica-se que grande parte dos doentes com MERRF apresentam mutações heteroplásmicas afectando os nucleotídeos, nt-8344 (Shoffner *et al*, 1990) e mais raramente nt-8356, no gene mitocondrial que codifica para o RNA de transferência da lisina (tRNA<sup>Lys</sup>). Outras localizações estão também descritas em casos isolados. A mutação do nt-8344 já foi encontrada associada a outro fenótipo clínico, o S. Leigh (Howell *et al*, 1996).

### **Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e acidentes vasculares cerebrais**

O síndrome encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e acidentes vasculares cerebrais (MELAS) adquiriu a sua identidade com Pavlakis em 1984 através do estudo de dois novos casos e de mais nove revistos da literatura, dando relevância aos aspectos clínicos e à hereditariedade materna. Caracteriza-se pelo aparecimento de acidentes vasculares cerebrais em doentes jovens (antes dos 40 anos de idade), encefalopatia, convulsões ou demência e evidência de disfunção mitocondrial com acidose láctica ou RRFs (Goto *et al*, 1990, 1992; Degoul *et al*, 1991; Inui *et al*, 1991). São também frequentes, enxaquecas, vômitos, intolerância ao exercício, hemiparésia aguda, cegueira cortical e pequena estatura.

Os acidentes vasculares cerebrais constituem o aspecto principal de MELAS.

Não está ainda esclarecida qual a sua etiologia, uma vez que a TAC e a RMN têm mostrado que as lesões cerebrais não têm uma localização concordante com as artérias cerebrais principais; através de técnicas de histoquímica para a SDH tem sido observada acumulação de mitocôndrias nas paredes das pequenas artérias e capilares do músculo e na *pia mater*. Estas anomalias ao nível dos pequenos vasos podem contribuir para a patogénese dos acidentes vasculares cerebrais no MELAS.

No estudo histológico da biópsia muscular encontram-se RRFs mas, contrariamente ao que sucede com a maioria das outras doenças em que as RRFs estão presentes, muitas das fibras musculares, incluindo as RRFs, são COX positivas. Outro aspecto importante do ponto de vista histológico do fenótipo MELAS são os vasos sanguíneos fortemente SDH positivos.

A este tipo de encefalopatia estão associadas várias mutações: a primeira, presente em cerca de 80% dos casos, corresponde à substituição de uma base A por G, no nt-3243, do gene que codifica para o RNA de transferência da leucina na síntese proteica mitocondrial - tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (Goto *et al*, 1990); a segunda mutação, presente em cerca de 10% dos casos de MELAS, corresponde à substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) no nt-3271 do mesmo gene (Goto *et al*, 1992); uma terceira mutação menos frequente, foi encontrada neste gene, correspondendo à substituição de uma C por T no nt-3256 (Moraes *et al*, 1993). Em casos pontuais foram encontradas mutações em genes que codificam para cadeias polipeptídicas dos complexo I e IV (Degoul *et al*, 1991). Associadas a este fenótipo clínico foram ainda publicadas as seguintes mutações: T3291C (Goto *et al*, 1994), T5814C (Manfredi *et al*, 1994), T9957C (Manfredi *et al*, 1995) e G13513A (Santorelli *et al*, 1997). A mutação T8356C (Silvestri *et al*, 1992), normalmente associada ao MERRF, também pode estar presente neste fenótipo clínico. Todas as mutações são heteroplásmicas e têm uma elevada percentagem de mtDNAs mutados no músculo.

### **Oftalmoplegia externa progressiva de transmissão materna**

A oftalmoplegia externa progressiva (PEO) caracteriza-se pelo aparecimento na infância ou adolescência de fraqueza dos músculos extraoculares, com diplopia e ptose, sendo frequentemente acompanhada de fraqueza dos membros (Harding *et al*, 1994; Munnich *et al*, 1992). Doentes típicos de MELAS ou MERRF podem apresentar, ainda que raramente, oftalmoplegia externa progressiva, que pode também aparecer no

síndrome de Kearns-Sayre (patologia multissistêmica tipicamente esporádica) (Vilarinho *et al*, 1998). No estudo histológico da biópsia muscular encontram-se RRFs. Algumas das fibras musculares podem ser COX positivas (como no MELAS), mas há também um número significativo de fibras COX negativas.

Cerca de 20% dos doentes com PEO têm uma história familiar positiva consistente com hereditariedade materna (Moraes *et al*, 1989). Do ponto de vista molecular apresentam mutações pontuais em vários tRNAs (tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> tRNA<sup>Ile</sup> e tRNA<sup>Asn</sup>).

### **Síndrome de Leigh de transmissão materna (MILS); neuropatia, ataxia e retinite pigmentar (NARP)**

O síndrome de Leigh de transmissão materna (MILS) e a neuropatia, ataxia e retinite pigmentar (NARP) caracterizam-se por atraso de desenvolvimento, demência, degenerescência pigmentar da retina, convulsões, ataxia, fraqueza muscular proximal neurogénica e neuropatia sensitiva (Wallace *et al*, 1992).

O NARP manifesta-se em adultos jovens com uma grande heterogeneidade fenotípica e cursa com uma evolução lenta. A acidose láctica nem sempre está presente e não existem RRFs, no entanto a microscopia electrónica revelou em algumas situações pequenos agregados de mitocôndrias subsarcolémicos e, ocasionalmente, cristas mitocondriais anormais. As fibras musculares são COX-positivas. A nível molecular verifica-se que o NARP está associado a duas mutações pontuais diferentes que afectam o mesmo nucleotídeo (nt-8993), no gene que codifica para a subunidade 6 do complexo V (ATPase 6). A mutação mais comum corresponde à substituição de uma base timina por uma guanina (T8993G) (Holt *et al*, 1990) e a outra à substituição da timina por citosina (T8993C) (deVries *et al*, 1993). Quando a proporção da mutação T→G no nt-8993 é muito alta (superior a 90%), o fenótipo clínico deixa de ser NARP passando a ser o de uma encefalopatia fatal - síndrome de Leigh de transmissão materna (MILS).

O síndrome de Leigh (SL) (Tatuch *et al*, 1991; Santorelli *et al*, 1993; Ciafaloni *et al*, 1993; Santorelli *et al*, 1994) é uma doença multissistêmica de aparecimento no primeiro ano de vida. Os doentes com MILS apresentam em 40% dos casos retinite pigmentar e têm uma manifestação clínica mais precoce com deterioração neurológica mais rápida do que os doentes com outros défices enzimáticos mitocondriais de transmissão provavelmente autossómica recessiva ou recessiva ligada ao cromossoma

X, que também têm sido associados ao SL: piruvato desidrogenase (PDH), citocromo *c* oxidase (COX ou complexo IV da CRM), NADH-coenzima Q oxido-redutase (complexo I da CRM). Todas as alterações reflectem uma disfunção mitocondrial, nem sempre confinada à CRM.

### **Diabetes e surdez**

Um elevado número de doentes com mutações mitocondriais manifestam sintomas de diabetes mellitus do tipo II com início relativamente precoce. Têm sido descritos casos de diabetes de transmissão materna, frequentemente associados a situações de surdez. Nestes casos, as RRFs estão presentes podendo haver uma mistura de fibras COX positivas e COX negativas.

Os casos de diabetes e surdez (DAD) têm na sua origem mutações pontuais em genes codificantes para vários tRNAs (apresentando com alguma frequência a mutação mais comum do MELAS). Foram igualmente descritas, famílias com duplicações do mtDNA, assim como com a mutação T14709C (Hanna *et al*, 1995).

A surdez mitocondrial pode fazer parte dos sintomas das doenças multissistémicas ou ser o único sintoma. A surdez isolada de transmissão materna, é causada por mutações em dois genes mitocondriais: a substituição homoplásmica A em G na posição 1555 do gene rRNA 12S e a substituição heteroplásmica T em C no nucleótido 7445 do gene tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>. Ambas as mutações são de penetrância baixa, sugerindo que outros factores genéticos e/ou ambientais possam ter um papel importante na progressão da doença. Por exemplo a mutação A1555G é considerada uma mutação de "predisposição", uma vez que, a surdez surge após tratamento não tóxico com o antibiótico aminoglicosídeo (Prezant *et al*, 1993; Hutchin *et al*, 1993).

### **Outras patologias**

Mutações pontuais em vários tRNAs têm sido identificadas em miopatias isoladas, cardiomiopatias, doenças multissistémicas com cardiopatia, surdez neurosensorial e défice fatal da CRM (Garcia Silva *et al*, 1989; Silvestri *et al*, 1994).

### 3.2 Doenças associadas a alterações espontâneas do mtDNA

Algumas alterações do mtDNA surgem espontaneamente sem que haja uma componente genética envolvida: estas mutações não se encontram nos progenitores nem na descendência dos probandos. São mutações de natureza esporádica e incluem as deleções simples de grandes dimensões e eventualmente as duplicações do mtDNA (estas estão frequentemente associadas a deleções e a uma hereditariedade materna). Encontram-se descritas mais de uma centena de deleções e várias duplicações, no entanto, cerca de um terço dos doentes exibem a mesma (Schon *et al*, 1989) por isso denominada "deleção comum", correspondendo à subtracção de 4977 pares de bases do mtDNA entre o gene da ATPase 8 e o da ND5.

#### Síndrome de Kearns-Sayre esporádico

O síndrome de Kearns-Sayre (KSS), descrito em 1958 por Kearns e Sayre, um oftalmologista e um patologista, é uma doença esporádica que se define pela associação de PEO com retinite pigmentar antes dos 20 anos e de pelo menos uma das seguintes situações: bloqueio da condução cardíaca, síndrome cerebeloso, ou proteinorráquia superior a 100 mg/dL. Os doentes podem ainda apresentar insuficiência renal, alterações endócrinas (nomeadamente hipoparatiroidismo e diabetes mellitus), perda auditiva e fraqueza proximal dos membros (Moraes *et al*, 1991; Herzberg *et al*, 1993). Usualmente o bloqueio cardíaco é resolvido através da colocação de um *pacemaker*, embora a esperança de vida destes doentes não ultrapasse a segunda década.

As RRFs estão normalmente presentes, sendo COX negativas. Em doentes com KSS foram encontradas grandes deleções que aparecem espontaneamente nas fases iniciais da oogénese ou da embriogénese (Zeviani *et al*, 1988; Moraes *et al*, 1989) e duplicações (Poulton *et al*, 1995) do mtDNA.

#### PEO esporádica

As deleções e duplicações (Schon *et al*, 1992; Bernes *et al*, 1993), encontram-se não só no KSS mas também associadas a um fenótipo menos grave, a PEO esporádica, que se apresenta com paralisia dos movimentos oculares e ptose, por vezes combinada com fraqueza proximal dos membros não sendo os restantes órgãos afectados. As RRFs estão normalmente presentes e são COX negativas (Moraes *et al*, 1991).

### **Síndrome de Pearson**

O síndrome de Pearson (Rötig *et al*, 1989; Blaw *et al*, 1990; Baerlocher *et al*, 1990; Bernes *et al*, 1993) é uma doença hematológica rara, com início no primeiro ano de vida, que cursa com anemia sideroblástica, pancitopenia e insuficiência do pâncreas exócrino. Mesmo após repetidas transfusões de sangue, a maioria dos doentes não sobrevive muito tempo. Alguns doentes com síndrome de Pearson evoluem mais tarde para um fenótipo de KSS. Sob o ponto de vista molecular, caracteriza-se pela presença de uma deleção simples, numa quantidade superior a 80% do mtDNA total no sangue periférico.

### **3.3 Doenças associadas a rearranjos no mtDNA de transmissão materna**

Apesar da maioria dos "rearranjos" do mtDNA surgirem espontaneamente, há situações em que a mãe com PEO ou KSS e deleções no mtDNA pode transmitir o DNA mutado à descendência (Poulton *et al*, 1991). Duplicações do mtDNA de transmissão materna foram também encontradas associadas a manifestações cerebrais, renais e insuficiências endócrinas.

### **3.4 Doenças associadas a alterações do mtDNA de transmissão mendeliana**

A PEO de transmissão autossômica dominante foi o primeiro defeito de comunicação intergenômica a ser descrito (Zeviani *et al*, 1989) e quase invariavelmente associado a deleções múltiplas no DNA muscular, detectáveis pela análise de *Southern blot*. A PEO de transmissão autossômica recessiva também está associada a deleções múltiplas (Carrozo *et al*, 1998). Estas duas formas de PEO podem apresentar-se como miopatias puras, especialmente a PEO autossômica recessiva, embora em casos raros.

#### **PEO de transmissão autossômica dominante e recessiva**

As PEO de transmissão autossômica dominante têm uma apresentação clínica idêntica às PEOs de transmissão materna e esporádica. Por vezes, ainda incluem surdez, tremor, cataratas e doenças psiquiátricas (DiMauro *et al*, 1999<sup>a</sup>) Nas biópsias musculares encontram-se RRFs que são COX negativas.

Os membros das famílias afectadas possuem nas fibras musculares grandes

quantidades de diferentes tipos de deleções (deleções múltiplas) do mtDNA que aparentemente se formaram nos primórdios da vida do indivíduo (Servidei *et al*, 1991). Tem sido demonstrada uma grande heterogeneidade na transmissão das deleções múltiplas. Num fenótipo clínico de PEO, Suomalainen *et al*, em 1995, publicaram o primeiro *locus* autossômico no cromossoma 10q23.3-q24.3 que predispõe o mtDNA para deleções múltiplas. No ano seguinte, um segundo *locus*, no cromossoma 3p14.1-21.2, foi publicado (Kaukonen *et al*, 1996), tendo-se demonstrado que estas deleções aumentam com a idade. Recentemente, um terceiro *locus* foi identificado no cromossoma 4p (Kaukonen *et al*, 1999).

As PEO de transmissão autossômica recessiva fazem parte de dois síndromes distintos, um que se caracteriza por miopatia e cardiomiopatia severa (Bohlega *et al*, 1996) e outro o MNGIE (Bardosi *et al*, 1987; Hirano *et al*, 1994).

### **Encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial**

A encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) é uma doença multissistémica que tem início entre a segunda e a quinta décadas de vida e que se apresenta com ptose, PEO, disfunção gastrointestinal grave, *habitus* longilíneo, neuropatia periférica, miopatia, leucodistrofia e acidose láctica.

O primeiro doente foi descrito por Okamura *et al*, 1976 como uma "miopatia oculoesquelética com mitocôndrias anormais no músculo e fígado". A designação e o síndrome foram introduzidos em 1987 por Bardosi *et al*, e desde então mais de 35 doentes foram já descritos com diferentes siglas como POLIP (polineuropatia, oftalmoplegia, leucoencefalopatia e pseudo-obstrução intestinal), OGIMD (distrofia muscular oculogastrointestinal) e MEPOP (encefalomiopatia mitocondrial com polineuropatia, oftalmoplegia e pseudo-obstrução).

Hirano *et al*, em 1994 propuseram uma ligeira modificação ao nome desta doença substituindo *mio* por *mitochondrial* para demonstrar o envolvimento mitocondrial que encontraram em cerca de metade dos doentes estudados. Através da análise de *linkage* em famílias com MNGIE, o *locus* desta doença autossômica recessiva foi localizado no cromossoma 22q13.32-qter (Hirano *et al*, 1998). Mais recentemente, foi identificado o gene que codifica a enzima timidina fosforilase (TP; EC 2.4.2.4.), (Nishino *et al*, 1999) e várias mutações já foram caracterizadas. A referida enzima cataliza a fosforilação da timidina que parece ter um papel importante no metabolismo

nucleosídico regulando a disponibilidade da timidina para a síntese de DNA. O mecanismo patogénico da MNGIE pode estar relacionado com o metabolismo anormal da timidina, levando à alteração da replicação ou da manutenção do mtDNA.

Em cerca de metade dos doentes, a análise de *Southern-blot* ou *long-template PCR* evidencia deleções múltiplas ou depleção do mtDNA.

### **Depleção infantil fatal de mtDNA**

Um outro tipo de patologia mitocondrial de transmissão mendeliana está associado à diminuição da quantidade de mtDNA num determinado tecido ou órgão (Moraes *et al*, 1991). Nestes casos de depleção, os tecidos afectados exibem défice da CRM, proliferação mitocondrial maciça e diminuição da quantidade de mtDNA presente. Nos tecidos não afectados podem não ser detectáveis alterações bioquímicas nem genéticas. Clinicamente, apresentam-se como miopatias, ou encefalomiopatias podendo outras características estar associadas como o síndrome de Fanconi, falência hepática ou cardíaca e acidose láctica (Moraes *et al*, 1991; Tritschler *et al*, 1992; Figarella-Branger *et al*, 1992; Macmillan *et al*, 1996).

Estão descritas duas formas de apresentação, uma precoce e outra tardia. Na primeira, os sintomas surgem na altura do nascimento e a morte ocorre no primeiro ano de vida. Nestes casos o grau de depleção é grave, podendo atingir 98% da quantidade de mtDNA normal, mas está limitado a um ou dois tipos de tecido, por exemplo músculo isoladamente (Poulton *et al*, 1995), fígado isoladamente (Ducluzeau *et al*, 1999), ou músculo e rim conjuntamente.

Na forma de apresentação tardia, os sintomas aparecem por volta do primeiro ano de vida e são apenas musculares.

Se a depleção que atinge o músculo é uniforme, isto é, se todas as fibras musculares estão afectadas, a actividade da COX não é detectável e além disso existirá muito pouco ou mesmo nenhum mtDNA imuno-reactivo.

## **3.5 Doenças mitocondriais associadas a mutações do nDNA de transmissão mendeliana**

### **Miopia infantil por défice em citocromo c oxidase**

Existem duas formas da doença, uma fatal e outra reversível ou benigna. Quer na forma fatal, quer nas primeiras fases da forma reversível, a actividade da COX no músculo não é detectável e estão presentes RRFs, podendo efectuar-se o diagnóstico

diferencial destas duas situações por imunocitoquímica das biópsias musculares.

Na forma fatal, a doença manifesta-se no período neonatal com hipotonia, problemas respiratórios e acidose láctica. A insuficiência respiratória e morte surgem no decurso primeiro ano de vida. A transmissão é, aparentemente, autossómica recessiva.

A forma benigna tem uma apresentação clínica neonatal indistinguível da forma fatal. Contudo, se for controlada, tende a apresentar melhorias espontâneas com evolução para a normalidade. Esta recuperação é acompanhada pelo aparecimento gradual de actividade da COX no músculo.

### **Síndrome de Leigh**

Como referido anteriormente, o SL pode ter diferentes etiologias (DiMauro *et al*, 1999<sup>b</sup>). A primeira mutação nuclear descrita, num gene que codifica a CRM, foi identificada em dois irmãos na subunidade succinato desidrogenase do complexo II, na flavoproteína (Fp) (Bourgeron *et al*, 1995). O gene da subunidade Fp está duplicado no genoma humano (3q29; 5p15), mas somente o gene localizado no cromossoma 5 se expressa nas células híbridas somáticas. A mutação C1684T, que provoca a substituição Arg544Trp num local altamente conservado da proteína, foi detectada em homozigotia.

Outra mutação, uma duplicação de 5pb, foi recentemente identificada na subunidade 18-KD (AQDQ) do complexo I (van den Heuvel *et al*, 1998) num doente com SL. Este gene foi mapeado no cromossoma 5 e a duplicação, localizada na posição 466-470 (AAGTC), provoca uma alteração no local de fosforilação (Papa *et al*, 1996).

Posteriormente, mais cinco mutações associadas ao SL foram identificadas nos genes nucleares que codificam as subunidades do complexo I (Triepels *et al*, 1999; Loeffen *et al*, 1998 e Schuelke *et al*, 1999).

### **Fenocópias mitocondriais**

Há um grupo de doenças tipicamente não relacionadas com uma disfunção mitocondrial em geral, associadas a mutações específicas dos genes nucleares, que são exemplos de "fenocópias mitocondriais": incluem o síndrome de Lowe (Moraes *et al*, 1991<sup>c</sup>), o síndrome de Barth (Goto *et al*, 1990<sup>b</sup>) e o síndrome de Wolfram (Rötig *et al*, 1992). Nos três síndromes foram identificadas deleções simples do mtDNA. Outros casos, como o síndrome de Usher, foi descrito em alguns doentes com a mutação NARP

(Uziel *et al*, 1997). Outras doenças neurológicas como a esclerose múltipla, podem ser simuladas por mutações pontuais causadoras da doença de Leber.

### **Síndrome de Wolfram**

Nos doentes com síndrome de Wolfram (DIDMOAD - Diabetes Insípida, Diabetes Mellitus, atrofia óptica, surdez forma mitocondrial) foi igualmente identificado um *locus* 4p16 (Barrientos *et al*, 1996<sup>a</sup>) que pode provocar uma predisposição a deleções. Foi identificada uma proteína mitocondrial denominada *wolframina*.

### **Doença de Barth**

A doença de Barth caracterizada clinicamente por cardiomiopatia hipertrófica apresenta alterações a nível estrutural da mitocôndria. O gene responsável por esta doença está localizado no cromossoma X (Bolhuis *et al*, 1991). Foi identificada uma proteína mitocondrial denominada *topomina*.

### **Ataxia de Friedreich**

É uma ataxia relativamente comum (1/50.000 nados vivos), caracterizada por um desequilíbrio progressivo e ausência de reflexos nos membros inferiores (Geoffroy *et al*, 1976; Harding 1981).

O gene associado a esta doença foi mapeado em 9q13 (Chamberlain *et al*, 1996) e codifica uma proteína com 210 aminoácidos, denominada frataxina. A ataxia de Friedreich é devida, em 98% dos casos, a expansões do triplete *GAA* no primeiro intrão deste gene.

A cardiomiopatia hipertrófica está presente na maioria destes doentes e no músculo cardíaco tem sido referido um aumento do teor de ferro (Sanchez-Casis *et al*, 1997). Vários estudos sugerem que a frataxina tem um papel importante na regulação do transporte do ferro mitocondrial (Babcock *et al*, 1997; Foury *et al*, 1997). Recentemente foram publicados dois casos com esta doença (Rötig *et al*, 1997) que confirmam, em biópsias do miocárdio, a actividade enzimática deficiente das subunidades dos complexos I, II e III da CRM que contêm o *cluster* ferro-enxofre (Fe-S), bem como da aconitase que é uma proteína Fe-S envolvida na homeostase do ferro.

A ataxia de Friedreich deve ser considerada como uma doença mitocondrial codificada pelo nDNA, em virtude da localização por microscopia de fluorescência da frataxina nas mitocôndrias humanas (Koutnitkova *et al*, 1997) e dado que as mutações

da frataxina causam défices da aconitase e dos complexos enzimáticos (Fe-S dependentes) da CRM. Provavelmente esta doença é desencadeada pelo *stress* oxidativo devido à acumulação de ferro na matriz mitocondrial.

### **Paraplegia espástica familiar**

Uma forma recessiva de paraplegia espástica familiar é devida à mutação na paraplegina que é uma metalo-protease mitocondrial codificada pelo nDNA (Casari *et al*, 1998).

### **3.6 Mutações adquiridas do mtDNA**

Vários autores postularam que com a idade, poderão surgir grande quantidade de mutações espontâneas no mtDNA, o que combinado com a baixa capacidade de reparação, contribui para o aumento de mutações no mtDNA. Este facto levará a uma disfunção da OXPHOS e aumento de produção de radicais livres de oxigénio, que por sua vez, conduzirão à “mutagénesis” do mtDNA, estabelecendo-se assim um ciclo vicioso.

A terapia com zidovudine ou azotimidina (AZT) nos doentes infectados com HIV pode também provocar uma miopatia mitocondrial devido à depleção do mtDNA resultante da inibição da  $\gamma$ -polimerase do mtDNA (Dalakas *et al*, 1990) e consequente inibição da replicação do mtDNA (Mhiri *et al*, 1991). Nestes casos há regressão da depleção após o tratamento ser descontinuado.

### *Nota final*

As mitocôndrias são organelos ímpares formados por uma acção concertada de dois genomas, o nuclear e o mitocondrial, o que as torna únicas do ponto de vista genético. As citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças com um largo espectro de sintomas e sinais, devidas ao anormal funcionamento metabólico da mitocôndria, em larga escala atribuídos a alterações do mtDNA.

A necessidade de esclarecer bioquímica e geneticamente estas situações levou-nos ao implemento da metodologia necessária a um diagnóstico preciso destas patologias. Assim, considerando que os défices da CRM apresentam uma grande variabilidade na expressão fenotípica, neste trabalho partimos da análise dos fenótipos bioquímicos para a caracterização dos genótipos associados. No entanto, há uma dificuldade evidente na correlação do genótipo/fenótipo dado que um genótipo pode estar associado a vários fenótipos, e vários genótipos ao mesmo fenótipo.

O principal objectivo deste projecto foi desenvolver um protocolo de investigação de défices da CRM na população portuguesa e caracterizar sob o ponto de vista histopatológico, metabólico e genético os doentes clinicamente suspeitos. Este facto revelou-se importante na medida em que os défices da CRM constituíam um grupo de doenças pouco estudadas no nosso país. Os resultados obtidos permitiram ainda fornecer dados da população portuguesa, os quais contribuem para o conhecimento desta patologia a nível mundial.

**Parte II**

---

**Projecto de Investigação**

## **Objectivos deste trabalho.**

### *Considerando que:*

- As alterações da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) provocam uma modificação no estado de redox celular que se traduz por um aumento do nível sérico de lactato, sobretudo após sobrecarga de glicose ou após exercício físico;
- As deficiências da CRM e as mutações do mtDNA têm sido associadas a um grande número de doenças com atingimento multissistémico;
- As deficiências da CRM são uma causa de morte neonatal, infantil e de morbilidade no adulto;
- Cada vez com mais frequência somos confrontados com alterações metabólicas nas quais deve ser equacionada uma etiologia mitocondrial;
- Só o diagnóstico preciso desta patologia permite uma adequada compreensão da evolução clínica da doença;
- Só a avaliação metabólica correcta permitirá a confirmação do diagnóstico e o posterior aconselhamento genético, destacando-se a possibilidade de hereditariedade materna;
- Uma abordagem multidisciplinar é essencial para o conhecimento da realidade portuguesa, no que se refere à incidência deste tipo de patologia;

### *Os principais objectivos deste trabalho foram:*

- i. *Desenvolver um protocolo bioquímico-molecular que permitisse o diagnóstico de défices da CRM, no nosso País .*

Procedeu-se para isso à montagem das técnicas necessárias à determinação da actividade enzimática dos complexos da CRM em músculo congelado (Anexo I) e à pesquisa das mutações mais frequentes associadas ao mtDNA.

*ii. Estudar retrospectiva e prospectivamente doentes com suspeita clínica e/ou histológica de défices da CRM.*

Foram estudados 435 doentes clinicamente suspeitos. Em 24 casos (6%) tratou-se de um estudo retrospectivo, referente a doentes cujo estudo histopatológico da biópsia de músculo era sugestivo de citopatia mitocondrial. Os restantes 411 doentes (94%) eram novos casos que foram investigados a partir da suspeita clínica.

O diagnóstico foi estabelecido em 102 doentes e só foi efectuado, na maioria dos doentes, alguns anos após as primeiras manifestações, dada a dificuldade da confirmação laboratorial destas situações.

*iii. Efectuar estudos familiares para identificação de novos casos (assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos), estabelecimento do tipo de hereditariedade associada e respectivo aconselhamento genético.*

Na sequência do diagnóstico molecular de 16 probandos com mutações pontuais, foram estudados 32 membros da linha materna de oito destas famílias, o que permitiu diagnosticar mais 12 indivíduos portadores da mutação (sintomáticos, oligossintomáticos ou assintomáticos). A investigação das restantes famílias encontra-se em curso. Em 18 doentes foi referida a existência de consanguinidade, o que pode sugerir um padrão de transmissão hereditária autossómica recessiva.

A história familiar dos 27 doentes com deleções simples de grandes dimensões foi negativa, o que corrobora o aspecto esporádico da grande maioria destas mutações, que ocorrem numa fase avançada da embriogénese.

*iv. Pesquisar novas mutações no mtDNA, nos casos de RRFs e sem mutações mais comuns associadas.*

Nos casos em que o estudo miopatológico era sugestivo de alterações mitocondriais foram sequenciados alguns dos 22 tRNAs do mtDNA, para pesquisa de mutações novas ou menos frequentes. Foram encontrados 27 polimorfismos dos quais oito não se encontravam descritos.

*v. Avaliar os diferentes fenótipos clínicos associados à mesma mutação e/ou diferentes mutações com fenótipo comum.*

Nem sempre foi possível classificar os doentes segundo os síndromes classicamente associados a doenças mitocondriais, só quando as queixas principais o permitiram.

A mutação MELAS A3243G ilustra bem a larga variedade de fenótipos clínicos que podem estar associados ao mesmo defeito genético, como sucede nas cinco famílias estudadas (6 probandos). Neste estudo houve ainda dois fenótipos, o síndrome de Leigh e a PEO que foram encontrados associados a vários genótipos .

*vi. Estabelecer as bases epidemiológicas destas patologias no nosso país.*

Neste trabalho foram estudados 435 indivíduos, provenientes de hospitais de todo o país. Trata-se de uma amostra representativa para o estudo deste tipo de patologia considerando, que abrange todos os grupos etários (2 dias aos 82 anos) e a diversidade da sintomatologia apresentada.

A análise mutacional veio confirmar dados avançados por outros estudos realizados até ao momento, com casuísticas semelhantes à nossa. As mutações mais prevalentes na são as já identificadas noutras populações.

*Estes estudos assim como os respectivos resultados e conclusões estão descritos nos capítulos seguintes.*

**Parte III**

---

**Trabalho Experimental**

## **1. Seleção dos doentes**

### **1.1 Origem e período de estudo**

O presente estudo incidiu sobre 435 indivíduos, provenientes dos Serviços de Neurologia, Pediatria e Neuropediatria e Unidades de Cuidados Intensivos de hospitais de todo o País, que foram investigados durante um período de cinco anos (1995-1999), ao longo dos quais o próprio conceito de "doenças da cadeia respiratória mitocondrial" foi também evoluindo. Por este facto, o diagnóstico de citopatia mitocondrial foi frequentemente tardio, após exclusão de muitas outras patologias.

A qualidade da informação clínica disponível é muito variável, sendo na maioria dos casos limitada ao resumo da justificação do pedido de exame, feito por neurologistas com diferentes graus de interesse neste grupo de doenças. A informação é mais completa, incluindo idade de início da doença, primeiras manifestações e um exame neurológico mais detalhado, nos doentes investigados nos Serviços de Neurologia dos Hospitais Maria Pia (HMP) e Geral de Santo António (HGSA), do Porto.

### **1.2 Metodologia**

#### **1.2.1 Critérios de suspeita clínica**

A seleção dos doentes com défices da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) foi baseada nos dados clínicos, miopatológicos e bioquímicos (estado de oxidação-redução da célula e défices enzimáticos dos diferentes complexos da CRM). Não tendo por base um estudo clínico sistematizado e sujeito a um protocolo de registo, pretendeu-se neste capítulo inventariar as bases da suspeita clínica e tentar determinar quais os sintomas e sinais (ou seus agrupamentos) mais fiáveis em termos diagnósticos. Na história familiar foi sempre avaliada a possibilidade de uma hereditariedade materna associada.

Em 24 dos casos (6%), tratou-se de um estudo retrospectivo, referente a doentes cujo estudo histopatológico da biópsia de músculo era suspeito de citopatia mitocondrial e dos quais se dispunha de material que se encontrava acondicionado a menos 80°C na

Unidade de Neuropatologia do HGSA. Os restantes 411 doentes (94%) foram novos casos investigados a partir da suspeita clínica.

### Características da população estudada

*Idade:* não foi possível, por falta de informação, estudar a variação da idade de início da sintomatologia. Os 435 doentes investigados apresentavam no momento da biópsia muscular idades compreendidas entre 2 dias e 82 anos. A distribuição etária encontra-se representada na Figura 1-1: 25 (5,7%) recém-nascidos, 55 (12,6%) com idades compreendidas entre 1 mês e 1 ano, 89 (20,5%) com idades compreendidas entre 1 e 5 anos, 122 (28,1%) com idades compreendidas entre 5 e 18 anos, 71 (16,3%) com idades compreendidas entre os 18 anos e 40 anos e 73 (16,8%) com idades superiores a 40 anos. Trata-se portanto de uma amostra representativa para o estudo deste tipo de patologia, considerando que abrange todos os grupos etários e também a diversidade de sintomatologia apresentada.

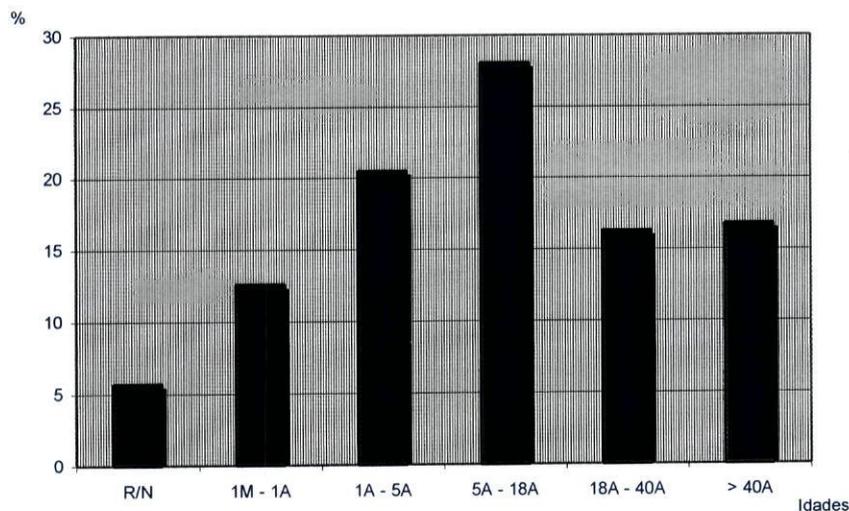


Figura 1-1 Distribuição etária dos 435 doentes suspeitos de citopatia mitocondrial investigados.

*História familiar:* em oito doentes houve suspeita duma hereditariedade materna e em 36 registou-se consanguinidade, o que pode sugerir um padrão de transmissão hereditária autossómica recessiva.

*Sexo:* quanto à distribuição por sexo a amostra foi equilibrada, com 47% do sexo feminino e 53% do sexo masculino.

## Registo dos casos em estudo

Para cada caso foi feito, com base na limitada informação clínica disponível, um registo de presença dos sintomas ou sinais isolados, ou dos síndromes bem conhecidos ligados a citopatias mitocondriais. Chegou-se assim a uma longa lista compreendendo 85 sintomas ou sinais, o que ilustra a enorme variabilidade de apresentação clínica neste grupo de doenças (Anexo II). Num segundo registo associaram-se do modo que pareceu mais lógico os referidos sintomas e sinais, formando-se 16 grupos a seguir discriminados para uma maior simplicidade de representação e análise. A Figura 1-2 representa a distribuição da informação clínica dos 435 indivíduos suspeitos de citopatia mitocondrial com base nos grupos sindromáticos respectivos.

1 - *Encefalopatia*: agruparam-se sob esta designação os 201 (46%) doentes com sintomas e sinais dependentes da disfunção das diversas estruturas encefálicas, nomeadamente atraso mental (ou microcefalia), epilepsia (ou síndrome de West ou mioclonias), alterações do comportamento ou autismo, síndrome piramidal (ou espasticidade), síndrome extrapiramidal parkinsoniano ou distónico (ou discinésias, tremor e “movimentos involuntários”) e ataxia (ou a menção a nistagmus ou atrofia cerebelosa). Foram ainda incluídos neste grupo casos com alterações imagiológicas tais como atrofia ou agenesia do corpo caloso, “leucodistrofia”, calcificações dos gânglios da base ou outros tipos de alterações encefálicas na imagiologia, e dezasseis doentes por acidentes vasculares cerebrais ou “hemiplegia”.

2 - *Oftalmoplegia externa progressiva (PEO)*: incluíram-se neste grupo 54 (12%) doentes com ptose, “miopatia ocular”, diplopia, estrabismo ou qualquer outra forma de alteração dos movimentos oculares.

3 - *Deficiências sensoriais*: em 28 doentes foi referida diminuição de visão (por cataratas, degenerescência pigmentar da retina ou atrofia óptica) e em 24 diminuição da audição.

4 - *Miopatia*: agruparam-se sob esta designação 205 (47%) doentes. Para além dos que apresentavam referência directa a miopatia, associaram-se também os casos em que foi mencionado hipotonia, intolerância e contracturas musculares com o exercício, caimbras ou mialgias e “fraqueza muscular” (excepto quando havia menção de sinais piramidais), rabdomiólise e mioglobínúria, “miosite”, distrofia muscular e até miastenia. Após

alguma hesitação foram aqui incluídos também os doentes com dificuldades de sucção, síndrome de dificuldade respiratória necessitando de ventilação mecânica, disfagia e disfonia.

5 - *Neuropatia periférica*: incluíram-se neste grupo, além dos doentes com este diagnóstico, os casos com hiporreflexia.

6- *Síndromes malformativas*: incluíram pés botos, cifoescoliose, artrogripose, facies peculiar e quadros polimalformativos variados.

7 - *Alterações endócrinas*: foram aqui incluídos a baixa estatura, o atraso do desenvolvimento estato-ponderal, a diabetes ou referência a hipoglicemia, insuficiência pancreática e hipertricose.

8 - *Alterações cardíacas*: em 20 (5%) doentes foi referida uma cardiomiopatia quer hipertrófica quer dilatada.

9 - *Alterações renais*: em quatro doentes foram descritas várias formas de atingimento renal: quistos, glomerulonefrite ou insuficiência renal crónica.

10 - *Alterações hepáticas*: em dez (2%) doentes foi identificada uma insuficiência hepática grave.

11 - *Alterações gastro-intestinais*: anorexia, vômitos e diarreia foram referidos em dez doentes.

12 - *Alterações hematológicas*: registou-se a existência de anemia em cinco casos e trombocitopenia em dois.

13 - *Alterações dermatológicas*: a existência de ictiose foi assinalada em dois casos.

14 - *Situações obstétricas*: outras suspeitas diziam respeito a patologia materno-infantil como prematuridade, atraso do crescimento intrauterino ou paragem cardiorespiratória da mãe durante o parto.

15 - *Citopatia mitocondrial*: em 39 dos doentes (9%), a investigação foi iniciada a partir de uma suspeita concreta de um dos quadros clínicos associados a citopatia mitocondrial: MELAS em 9 doentes, MERRF em 2, síndrome de Leigh/NARP em 10, LHON em 4, KSS em 14. Tratou-se por conseguinte de um diagnóstico directo de citopatia mitocondrial.

16 - *Outros*: em 85 (20%) doentes o diagnóstico proposto foi vago: “doença degenerativa” ou “coma” sendo levantada a suspeita não discriminada de citopatia mitocondrial.

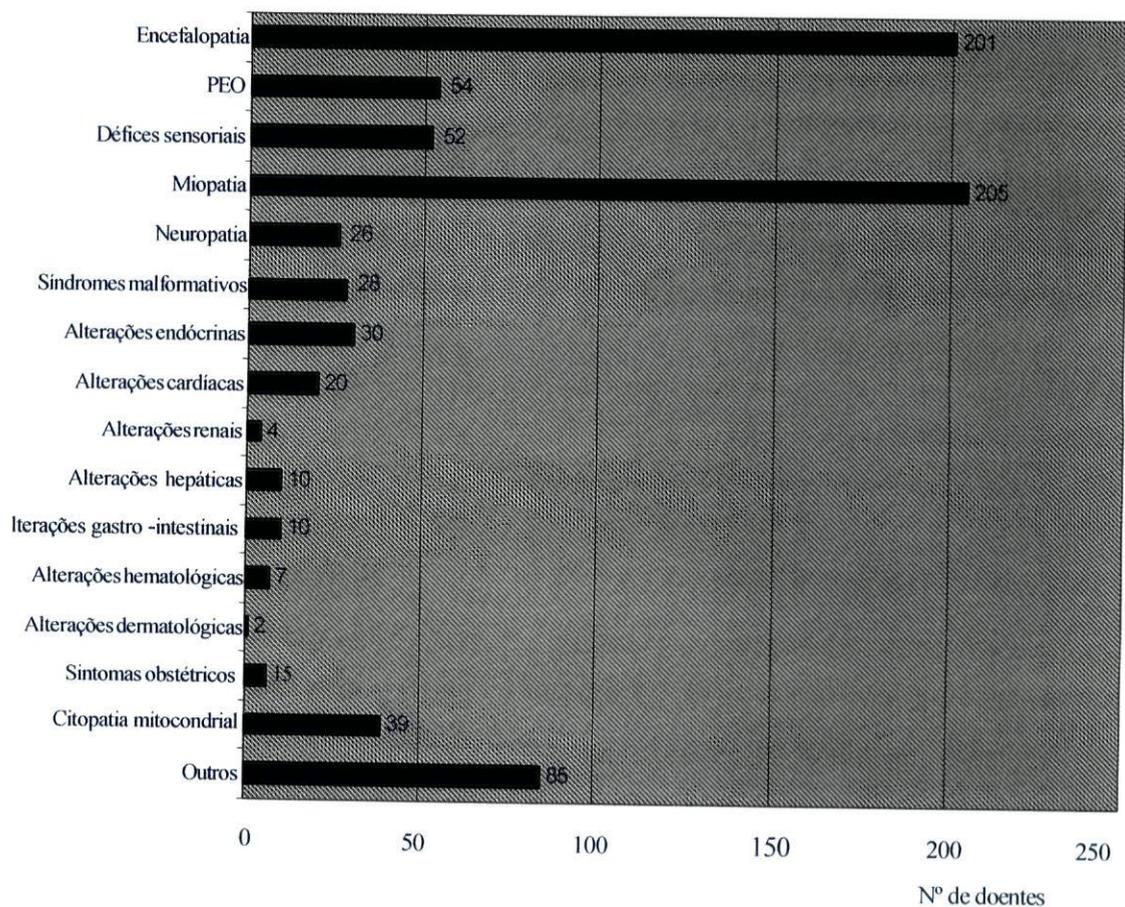


Figura 1-2 Distribuição da informação clínica dos 435 indivíduos suspeitos de citopatia mitocondrial com base nos grupos sindromáticos respectivos.

Tal como a informação clínica disponibilizada, a investigação analítica, neurofisiológica e imagiológica efectuada foi bastante variável; incluiu em alguns casos o estudo das enzimas musculares, electroencefalograma (EEG), electromiograma (EMG), electrocardiograma (ECG), ecocardiograma, tomografia axial computadorizada (TAC) cerebral e ressonância magnética nuclear (RMN) encefálica. Em nenhum doente foi efectuada o estudo da respiração mitocondrial muscular *in vivo* através da

espectroscopia de ressonância magnética com fósforo marcado (*phosphorus magnetic resonance spectroscopy*  $^{31}\text{P}$ -MRS) (Barbiroli *et al*, 1997) devido ao limitado número de equipamentos existentes no nosso País. Foram ainda registados os resultados do exame miopatológico (RRF, COX) e do estudo da CRM.

### 1.2.2 Critérios de suspeita miopatológica

A biópsia muscular foi realizada no músculo deltóide na grande maioria dos casos e no músculo curto peroneal lateral apenas quando era necessário fazer simultaneamente biópsia de nervo sensitivo. Quer o acto cirúrgico quer o processamento técnico subsequente dos fragmentos de músculo foram feitos nas suas linhas gerais segundo os métodos clássicos descritos (Dubowitz, 1973).

Após anestesia da pele com lidocaína foi feita uma incisão de 2 a 3 cm de comprimento, localizada a aponevrose e através duma incisão nesta, isolados os grupos de feixes de fibras musculares a serem colhidos, respeitando a orientação das fibras, de forma a que posteriormente pudessem ser obtidos cortes histológicos de topo ou longitudinais, com orientação adequada.

Logo após a sua colheita, os fragmentos de músculo foram divididos em dois ou três fragmentos cilíndricos com aproximadamente 8 x 5 mm que foram congelados em isopentano à temperatura do azoto líquido (-160°C) e posteriormente armazenados numa arca frigorífica a -80°C. Outros fragmentos, também cilíndricos com 2 mm de diâmetro foram imediatamente fixados em soluto de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato e posteriormente processados para inclusão em Epon e exame em microscopia electrónica. Outros fragmentos de forma e tamanho irregulares, foram introduzidos num tubo de Eppendorf e congelados para estudo da actividade dos complexos da CRM e posterior estudo molecular.

Dos fragmentos congelados foram posteriormente obtidos cortes de congelação num criostato a -20°C, para estudo histológico, que foram corados pela hematoxilina - eosina, PAS e tricrómico de Gomori e outros cortes foram destinados ao estudo histoenzimático.

Este estudo permitiu avaliar o aspecto global histológico do músculo e determinar qual o seu padrão de actividade histoenzimática. Eliminados outros tipos de

patologia muscular, foi prestada particular atenção às lâminas coradas pelo tricrómico de Gomori para evidenciação da actividade das desidrogenases, que permitiam mais facilmente localizar as fibras com alterações mitocondriais e aos cortes para evidenciação da citocromo *c* oxidase que mostravam as fibras com ausência de actividade desta enzima.

O estudo em microscopia electrónica foi utilizado quando o estudo histológico e histoenzimático não permitiram um diagnóstico claro. Todavia, apenas foi efectuado caso o estudo de cortes semifinos dos fragmentos incluídos em Epon (realizado em todos os casos) apresentasse alterações que devessem ser esclarecidas por este método.

Consideraram-se patológicos os músculos onde se evidenciaram: (1) mais de 3% de RRFs por fragmento ou (2) frequentes fibras com crescentes subsarcolémicos de hiperactividade da SDH; (3) mais de 3% de fibras por fragmento com ausência de actividade COX; ou (4) aqueles que não preenchendo os critérios quantitativos do número de fibras alteradas, apresentavam em microscopia electrónica evidentes alterações da ultraestrutura das mitocôndrias, nomeadamente inclusões paracristalinas (Romero *et al*, 1996).

A biópsia muscular assim como os respectivos estudos quer histológicos quer histoenzimáticos foram executados na Unidade de Neuropatologia do HGSA sob a direcção do Dr António Guimarães e gentilmente cedidos para este trabalho.

### 1.2.3 Critérios de suspeita bioquímica

#### Estudo de acumulação de metabolitos

Considerando que a biópsia de músculo é uma técnica invasiva, devemos proceder inicialmente a um rastreio metabólico que englobe os doseamentos de lactato (L) e piruvato (P) sanguíneos, cálculo das respectivas razões molares (L/P) e eventualmente determinação do lactato no LCR, antes de efectuar a referida biópsia. Em casos esporádicos foram efectuadas determinações dos corpos cetónicos sanguíneos, 3-hidroxiacetato (3OHB) e acetocetato (AA) e respectivas razões molares 3OHB/AA.

Quando estes testes são inconclusivos deve-se efectuar uma prova de sobrecarga glucídica, uma prova de esforço, ou uma avaliação do estado de oxidação-redução do LCR.

**Protocolo utilizado conducente à suspeita bioquímica de um défice da CRM:**

1- Determinação de lactato e piruvato (em jejum e uma hora após sobrecarga de glucose 2g/Kg ou prova de esforço).

*Resultados suspeitos: Hiperlactacidemia persistente (superior a 2,5mM); relação L/P superior a 25; lactacidemia que após prova de sobrecarga glucídica ou de esforço duplica, ou apresenta pelo menos, o aumento de uma unidade em relação ao resultado basal.*

2- Determinação dos corpos cetónicos (em jejum e 1 hora após sobrecarga de glucose).

*Resultados suspeitos: 3OHB e AA elevados; relação 3OHB/AA superior a 3 (Rötig et al, 1991).*

3- Cromatografia dos ácidos orgânicos

*Resultados suspeitos: Perfil anormal de ácidos orgânicos urinários por CG/MS secundário à disfunção mitocondrial. Excreção aumentada dos ácidos: láctico, 3-metilglutacónico, etilmalónico, 2-etilhidracrílico, metabolitos do ciclo de Krebs (ácidos fumárico, succínico, e málico) e corpos cetónicos (ácidos 3OHB e AA).*

4- Cromatografia dos aminoácidos

*Resultados suspeitos: Perfil anormal dos aminoácidos plasmáticos (hiperalaninémia) e/ou urinários (hiperaminoacidúria generalizada).*

**Estudo enzimático dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial**

A observação de um estado de oxido-redução plasmático anormal ou de um atingimento multissistémico levaram-nos a investigações mais aprofundadas que incluíram estudos espectrofométricos e enzimáticos.

A avaliação de um défice da CRM foi feita através da determinação da actividade dos diferentes complexos enzimáticos, com base no modo da transferência dos equivalentes reduzidos cedidos por substratos naturais ou artificiais (NADH, succinato, coenzima Q, citocromo *c*, ascorbato). A ubiquinona (CoQ-quinona lipoidal) e o citocromo *c* (hemoproteína de baixo peso molecular) actuam como *shuttles* entre os complexos (Figura 1-3).

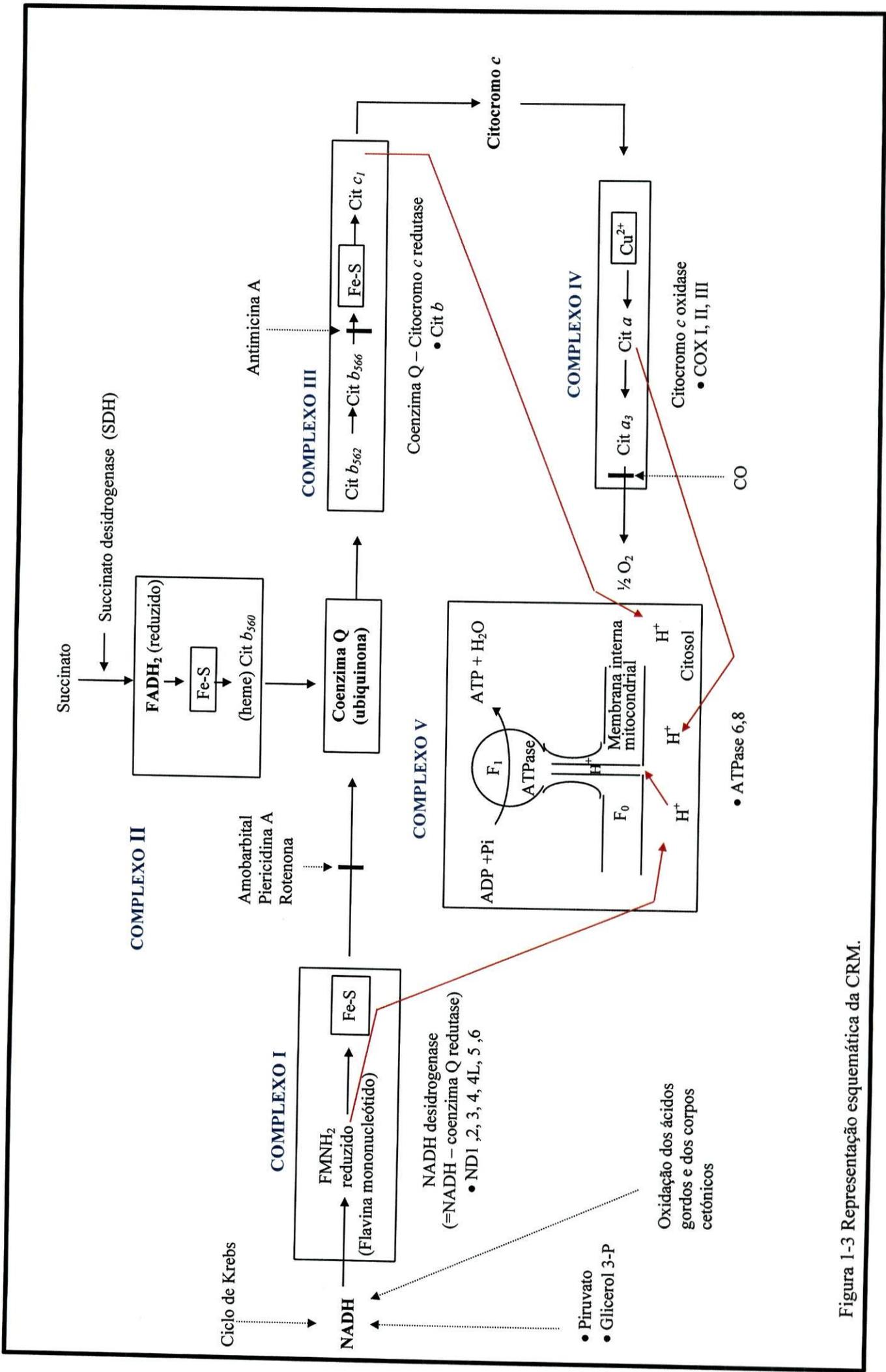


Figura 1-3 Representação esquemática da CRM.

Dado que não foi necessário isolar as mitocôndrias para este estudo, a quantidade de material biológico exigido foi reduzida (30-50 mg). As amostras, após colheita, foram imediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  ou mantidas em azoto líquido até serem analisadas.

Conforme foi referido anteriormente, as biópsias musculares foram efectuadas inicialmente na totalidade e mais recentemente em grande parte, no HGSA ou em hospitais centrais, mas nunca realizadas no Instituto de Genética Médica. Este facto condicionou à partida o estudo da cadeia respiratória sobre material fresco e impossibilitou o estudo enzimático do complexo V.

A metodologia implementada permitiu a determinação individualizada da actividade dos complexos I, II, III, e IV e conjunta dos complexos II e III da CRM (Anexo I). Foram eliminadas as interferências devidas às actividades inespecíficas, inerentes a outras enzimas presentes na amostra biológica, através da utilização de inibidores específicos adequados para cada um dos complexos. Simultaneamente com estes doseamentos foi sempre determinada a actividade da enzima citrato sintetase (CS) do ciclo de Krebs localizada na matriz mitocondrial e cuja deficiência é incompatível com a vida. Esta enzima foi utilizada como controlo da qualidade da amostra e do seu estado de conservação. Os resultados foram calculados em função das proteínas não colagénicas presentes no músculo e referidos à actividade daquela enzima.

As actividades dos diferentes complexos foram referidas à actividade da CS, dado serem determinações muito influenciadas pelo número de mitocôndrias existentes nas células e terem de ser normalizadas em função da actividade daquela enzima que é considerada o indicador do conteúdo mitocondrial (Zeviani *et al*, 1991).

Numa primeira fase foram determinados os valores de referência para as diferentes actividades enzimáticas da CRM muscular em 50 controlos normais e posteriormente foram estudados os indivíduos suspeitos. Todos os doseamentos foram efectuados em duplicado e os resultados comparados com controlos normais manipulados paralelamente com as amostras em estudo.

#### *Crítérios de suspeita de défice enzimático da CRM*

A análise dos resultados é por vezes delicada. Uma actividade normal da CRM não permite excluir um défice mesmo que o tecido testado seja aquele que exprime a

doença. É possível estarmos em presença duma mutação que afecta as propriedades cinéticas duma enzima, de uma heterogeneidade tecidular ou de um mosaicismo celular (heteroplasmia). É assim indispensável proceder ao estudo molecular, testar outros tecidos e eventualmente repetir estas investigações alguns anos mais tarde.

Os critérios utilizados para análise dos resultados foram os indicados por Collombet *et al*, 1993:

Défice severo - actividade do complexo inferior a 20 % do valor médio dos valores de referência.

Défice parcial - actividade do complexo entre 20 e 40 % do valor médio dos valores de referência. Dentro dos défices parciais considerámos que conforme a deficiência se cifra entre 20-30 % ou 30-40 %, assim o défice será *provável* ou *possível* como causa primária da doença. Estes dados foram sempre correlacionados com outros estudos e com o fenótipo clínico.

Os critérios acima referidos foram aplicados independentemente da idade do indivíduo, dado que não se observam diferenças significativas na actividade enzimática mitocondrial com o processo de envelhecimento muscular (Padrós *et al*, 1998).

A dispersão dos valores normais e a sua distribuição não gaussiana, dificultaram a identificação de um défice enzimático ligeiro, porque os valores normais, por vezes, se sobrepõem aos valores observados nos doentes. Assim, calculámos as razões entre as diferentes actividades dos complexos da CRM, pois é um dado importante, se considerarmos que um bom funcionamento da CRM, exige um equilíbrio constante entre os diferentes complexos. Os valores desta relação têm uma distribuição sensivelmente gaussiana tanto no músculo como nos fibroblastos contrariamente aos valores absolutos. Pode considerar-se patológica, com 95% de probabilidade, uma relação inferior à média menos dois desvios padrões (M-2DS). Este critério tem sido utilizado na interpretação de resultados enzimáticos da CRM (Rustin *et al*, 1991).

### 1.3 Doentes seleccionados

#### Grupos de doentes:

Com base nos critérios mencionados anteriormente, os 435 indivíduos estudados foram divididos em dois grupos, suspeitos não confirmados e doentes com diagnóstico confirmado de citopatia mitocondrial.

### **Doentes suspeitos não confirmados**

Correspondem a 333 doentes (175 do sexo masculino e 158 do feminino), com idades na altura da investigação compreendidas entre 2 dias e 82 anos, sendo a média de 9,2 anos.

### **Doentes com diagnóstico confirmado de citopatia mitocondrial**

Foram investigados 102 indivíduos com idades compreendidas entre 1 mês e 74 anos (média 15 anos). A amostra foi composta por 47 doentes pertencente ao grupo pediátrico (inferior a 16 anos) e 55 doentes jovens e adultos (Anexo III).

- a) *Sintomas e sinais:* A frequência relativa das diferentes manifestações nos doentes estudados está expressa na Figura 1-4. As manifestações mais frequentes foram a encefalopatia (38%), o quadro miopático (35%) e a PEO (32%) seguidas de alterações de visão e audição (31%). Entre 7-10% as alterações cardíacas e as alterações endocrinológicas, para além dos síndromes classicamente definidos (Leigh/NARP, LHON, MELAS, MERRF, MNGIE, KSS). As alterações gastro-intestinais, hepáticas e hematológicas foram manifestações pouco frequentes na presente série.
  
- b) *Variação da apresentação clínica segundo a idade:* A frequência de aparecimento dos diferentes síndromes variou nos diversos grupos etários. Assim, enquanto que a PEO é mais frequente nos adultos (57% em doentes com mais de 20 anos, 20% antes dessa idade), a epilepsia (25% até aos 20 anos e 5% depois dos 20 anos) e o atraso de desenvolvimento psicomotor (40% até aos 10 anos, 15% na adolescência e descendo para cerca de 7% no adulto) foram mais frequentes nos doentes jovens. A hipotonia foi uma referência relativamente frequente nas crianças com menos de dois anos (8%).

### **Comparação clínica entre os dois grupos de doentes**

As apresentações mais comuns foram os quadros encefalopáticos (47%), miopáticos (46%), e PEO (12%). Enquanto que os dois primeiros se revelaram indicadores pouco específicos de défice CRM, o último foi muito mais fiável. Inversamente, quadros mais raros, como baixa estatura, alterações oftalmológicas e otológicas, foram mais específicos.

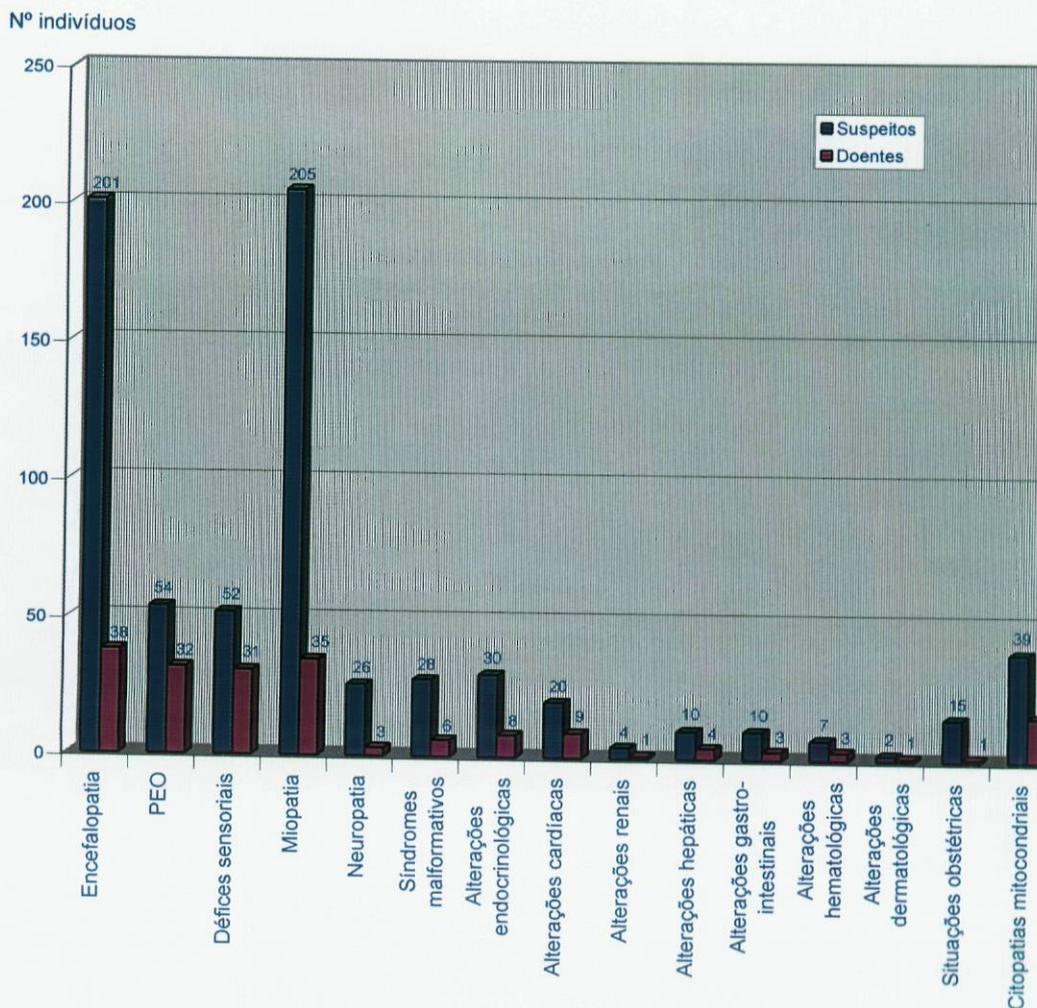


Figura 1-4 Frequência relativa das diferentes manifestações nos dois grupos de doentes estudados.

### Estudo neurofisiológico

Os estudos electromiográficos, segundo informação clínica fornecida, foram efectuados em nove doentes e os resultados disponibilizados estão sumarizados no Quadro 1-1. É importante relevar as escassas anomalias encontradas na EMG; somente num doente com uma miopatia grave a EMG revelou alterações compatíveis com uma miopatia necrosante (D81), os restantes cinco doentes apresentaram alterações miopáticas ligeiras na EMG.

### Estudo imagiológico

As imagens encontradas na TAC/RMN cerebral associadas com diferentes tipos de DCRM estão indicadas no Quadro 1-2. A imagiologia foi anormal em 14 dos 20 doentes em que foi efectuada, 5 deles com síndrome de Leigh/NARP.

Quadro 1-1 Dados da EMG

Normal EMG	Alterações miopáticas no EMG	Alterações neurogénicas no EMG
D29 3243/cardiomiopatia	D3 PEO	D9 Encefalomiopatia
D35 Encefalopatia	D4 PEO	D17 Encefalomiopatia
D91 Encefalomiopatia	D81 Miopatia	D21 PEO+

Quadro 1-2 Dados da imagiologia

Normal	Atrofia cerebral	Calcificações dos gânglios da base /leucodistrofia*	Padrão de hipodensidade nos gânglios da base/substância branca*
D29 3243/cardiomiopatia	D5 MELAS	D5 MELAS	D17 Encefalomiopatia
D35 Encefalopatia	D9 Encefalomiopatia	D24 Encefalopatia*	D69 Miopatia*
D57 Encefalopatia	D69 Encefalopatia		D73 Síndrome Leigh
D82 Miopatia	D92 Encefalomiopatia		D98 Alterações multissistémicas
D15 Encefalopatia			D33 NARP
D97 Encefalopatia			D56 Síndrome Leigh
			D86 Síndrome Leigh
			D90 Síndrome Leigh

### *Estudos histológicos e histoenzimáticos*

Segundo informações das Unidades de Neuropatologia, a análise histológica e histoenzimática das biópsias musculares de 96 doentes revelou um aumento da reactividade da SDH ou presença de RRFs em 65 doentes (69%), sendo 54 doentes com RRFs, 11 doentes com SDH e 37 doentes (39%) com fibras COX negativas.

### *Estudos bioquímicos*

A exploração metabólica foi efectuada em 40 dos 102 doentes confirmados fundamentalmente, na população pediátrica. Destes, 7 revelaram alterações nos perfis dos ácidos orgânicos e dos aminoácidos.

A hiperlactacidemia (2,6-18,4mM) foi detectada em 38 doentes (de 47 determinações), correspondendo em regra aos doentes mais novos. Destaca-se a elevação da razão lactato/piruvato em 30% dos doentes. O ácido láctico no LCR estava elevado em

4 das 6 crianças investigadas sendo de salientar que numa delas o ácido láctico plasmático encontrava-se dentro dos valores de referência.

*Estudos enzimáticos da CRM*

A determinação das actividades dos complexos enzimáticos da CRM dos doentes estudados permitiram pôr em evidência défices musculares em 77 dos 94 músculos estudados quando comparadas com os valores de referência (Figura 1-5). Os valores absolutos encontram-se discriminados no Anexo IV.

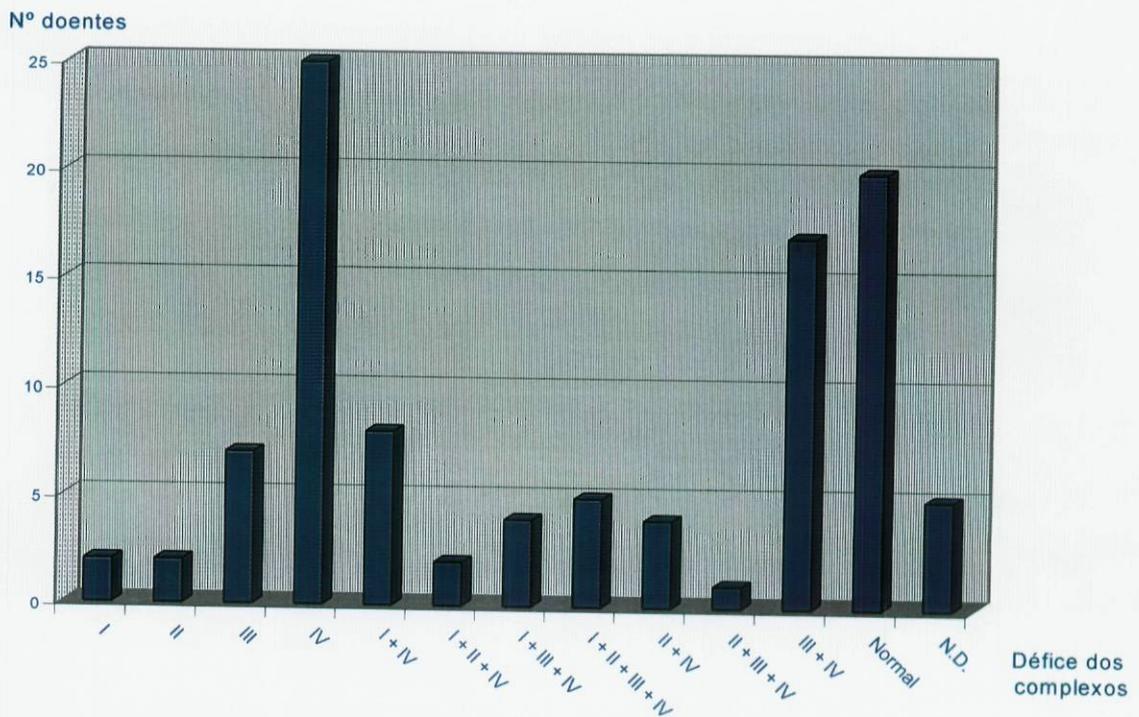


Figura 1-5 Resultados da CRM em 94 dos 102 doentes confirmados. (N.D.–não determinado)

Ao analisarmos estes resultados verificámos que o complexo IV foi o complexo enzimático mais vezes deficitário, quer isoladamente quer combinado com outros complexos. Os défices dos complexos I e II foram os menos prevalentes. Os doentes que apresentaram valores normais de CRM foram incluídos neste estudo, porque revelaram alterações miopatológicas sugestivas de citopatia mitocondrial.

A CRM não foi investigada em oito doentes, uma vez que seis não efectuaram biópsia muscular e dois não dispunham de biópsia muscular em quantidade suficiente. Nestes casos, dada a presença de um fenótipo característico procedeu-se directamente à pesquisa das mutações pontuais mais comuns em amostra de sangue.

Em quatro doentes que tinham revelado um défice do complexo IV no tecido muscular foram também estudados os respectivos fibroblastos cutâneos cultivados. Só num caso o défice se exprimiu nesta linha celular.

*Variação dos dados laboratoriais segundo a idade:*

A positividade dos diagnósticos neuropatológico, 65 dos 96 doentes, e enzimático, 77 dos 94, variou de forma diferente conforme a idade do doente. Demonstrou-se que no grupo de doentes com menos de 10 anos só 18% tinham RRFs, subindo esta percentagem para 30% nos adolescentes e 73% nos adultos. Os défices da CRM variam inversamente: superior a 40 % (31/77) até aos 10 anos e descendo progressivamente até 19 % (15/77) após os 40 anos de idade. No Quadro 1-3 e na Figura 1-6 estão representados os resultados dos estudos miopatológicos e enzimáticos e a taxa de positividade dos mesmos.

Idade (anos)	Nº indivíduos	RRFs	Défice da CRM
0 - 10	33	12	32
10 - 20	15	10	13
20 - 30	10	8	7
30 - 40	12	10	10
40 - 50	13	13	9
50 - 60	4	3	1
>60	9	9	5

Quadro 1-3 Resultados dos estudos miopatológicos e enzimáticos segundo os diferentes grupos etários.

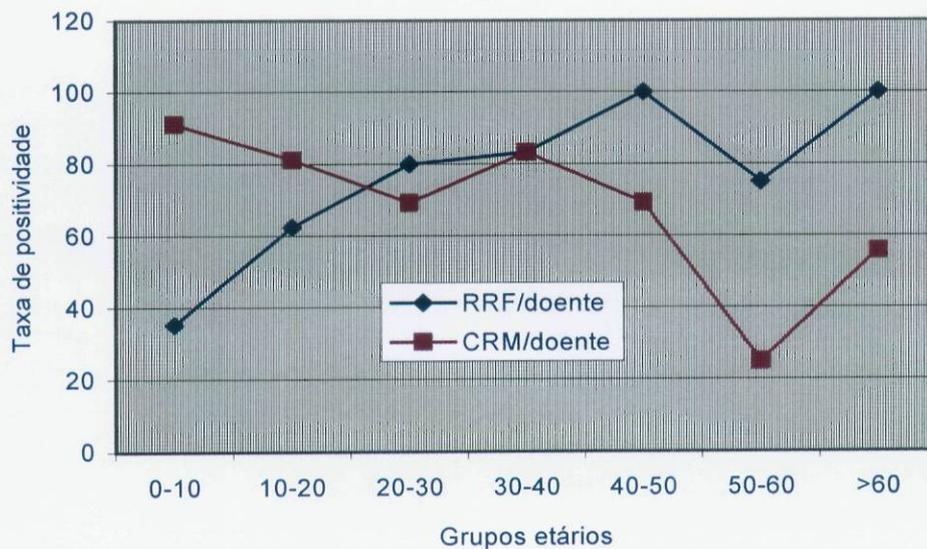


Figura 1-6 Variação da taxa de positividade dos dados miopatológicos (a azul) e enzimáticos (a vermelho) segundo a idade.

### **Crítérios de suspeita clínica**

Da análise dos doentes anteriormente referidos podemos considerar como critérios de suspeita clínica os seguintes dados :

- Sinais ou sintomas de envolvimento multissistémico.
- Associação inexplicável de sintomas neuromusculares e/ou não musculares.
- Síndromes característicos de citopatia mitocondrial (MELAS, MERRF, LHON, PEO, KSS).
- Evolução progressiva e rápida.
- Hereditariedade materna (história familiar positiva).
- Hiperlactacidemia e relação lactato/piruvato aumentada.
- Alterações no perfil dos ácidos orgânicos e/ou dos aminoácidos compatíveis com disfunção mitocondrial.
- Presença de RRFs, hiperactividade da SDH e/ou fibras COX negativas.
- Défice da actividade enzimática dos complexos da CRM.

## 2. Investigação molecular do mtDNA em doentes portugueses com citopatia mitocondrial

### 2.1 Introdução

Ao longo da última década surgiu um novo capítulo na patologia humana referente às mutações do “cromossoma 25” normalmente denominado mtDNA. O genoma mitocondrial foi descoberto há cerca de 35 anos (Nass *et al*, 1963) mas só recentemente foi demonstrada a sua importância na patogénese do sistema cadeia respiratória/fosforilação oxidativa (CR/OXPHOS).

Desde que foram identificadas, as primeiras mutações patogénicas neste genoma (Holt *et al*, 1988; Wallace *et al*, 1988) mais de 50 mutações (DiMauro *et al*, 1997) foram reconhecidas como causadoras de um largo espectro de apresentações clínicas. A maioria dos casos descritos são doenças multissistémicas que envolvem quer o músculo quer o cérebro, sendo designadas por encefalomiopatias mitocondriais, termo introduzido por Shapira *et al* em 1977, e constituem um grupo heterogéneo de patologias com diferentes manifestações clínicas e bioquímicas (DiMauro *et al*, 1993<sup>a</sup>). Na maioria dos casos, os estudos histopatológico e histoenzimático das biópsias musculares evidenciam RRFs ou uma hiperactividade da SDH e um défice da actividade enzimática da COX respectivamente.

A necessidade global de energia oxidativa e a presença ubiquitária das mitocôndrias (excepto nos eritrócitos maduros que vivem os seus últimos dias em glicólise anaeróbia) podem explicar a razão pela qual todos os tecidos são susceptíveis de serem afectados e originar doenças relacionadas com o mtDNA. Embora a maioria destas sejam multissistémicas, outras apresentações podem também resultar de mutações do mtDNA como: cardiomiopatias (Anan *et al*, 1995), diabetes mellitus (Kadowaki *et al*, 1994) e surdez (El-Schahawi *et al*, 1997). Nos diagnósticos diferenciais de muitas apresentações clínicas deve incluir-se a disfunção mitocondrial, justificando o termo recentemente aceite de "Medicina Mitocondrial" proposto por Rolf Luft que conjuntamente com Lars Ernster, em 1959, introduziram as doenças mitocondriais.

A taxa de substituição nucleotídica do mtDNA é 6 a 17 vezes superior à do nDNA (Wallace *et al*, 1995), o que provoca um elevado número de doenças associadas a

um genoma comparativamente tão pequeno. Este facto, pode ser imputado à falta de histonas protectoras, ao meio oxidante em que as moléculas se encontram, à maior susceptibilidade do mtDNA à mutagénese por factores exógenos, como radiações ionisantes e luz ultra violeta e aos mecanismos de reparação do mtDNA aquando da replicação serem muito limitados (quando comparados com os do nDNA) (Tritschler *et al*, 1993).

Os polimorfismos são mutações “neutras”, pois não resultam em alterações patológicas ou bioquímicas significativas. As mutações só são consideradas patogénicas se obedecerem aos seguintes critérios: (I) mudarem um nucleótido num local altamente conservado nas diferentes espécies animais; (II) ocorrerem num gene codificante e alterarem um codão e por conseguinte um aminoácido; (III) estarem ausentes na população controlo; (IV) possuírem expressividade clínica, transferindo-se para modelos experimentais e (V) serem heteroplásmicas.

A análise da variação genética não patogénica do mtDNA é importante para a identificação de novas mutações potencialmente patogénicas, dado que o estabelecimento de uma associação entre uma mutação e determinada patologia depende da exaustiva caracterização da variação genética na população normal (Wallace, 1995).

Sob o ponto de vista genético podemos dividir as doenças mitocondriais em três grupos, consoante o genoma envolvido: (I) as causadas por defeitos do nDNA; (II) as que são provocadas por defeitos do mtDNA (mutações pontuais, deleções e duplicações); e (III) as que são devidas a défices na comunicação entre os genomas nuclear e mitocondrial (as quais incluem deleções múltiplas e a depleção do mtDNA). Normalmente, não são descritas situações de hereditariedade materna associadas a deleções simples de grandes dimensões do mtDNA, pois estas ocorrem numa fase avançada da embriogénese e a maior parte são esporádicas. A mutação *de novo* é a explicação mais plausível para o seu aparecimento. A transmissão materna de deleções do mtDNA só raramente foi referida na literatura, particularmente na PEO materna (Poulton *et al*, 1991; Bernes *et al*, 1993).

Os genomas nuclear e mitocondrial estão separados, mas funcionam em coordenação aparentemente sob o controlo do genoma nuclear, dado que os factores codificados pelo nDNA são necessários para a transcrição, tradução e replicação do mtDNA. Actualmente, são conhecidas duas situações como sendo devidas a um defeito na comunicação entre os dois genomas. Uma é formada por um conjunto de doenças

autossômicas, podendo ser dominantes e recessivas com um fenótipo de PEO, ou mais raramente sem PEO (Takei *et al*, 1995) que se caracterizam pela presença de deleções múltiplas de diferentes tamanhos do mtDNA. A outra situação incluiu uma doença autossômica recessiva que atinge o músculo isoladamente ou como componente de doença multissistêmica e caracteriza-se por uma depleção mais ou menos grave do mtDNA devido a uma deficiência numa proteína codificada pelo nDNA (Moraes *et al*, 1991). Na Figura 2-1 está representada esquematicamente a molécula do mtDNA e a

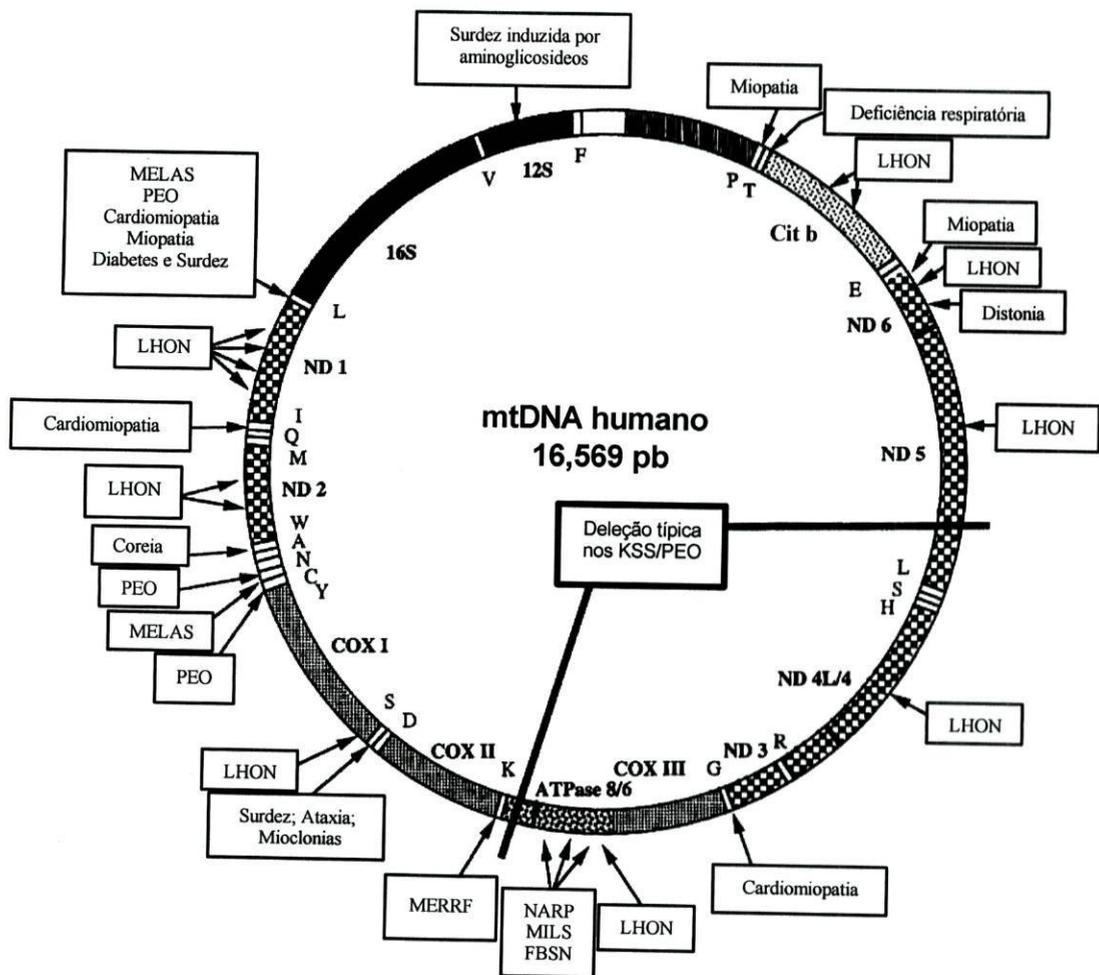
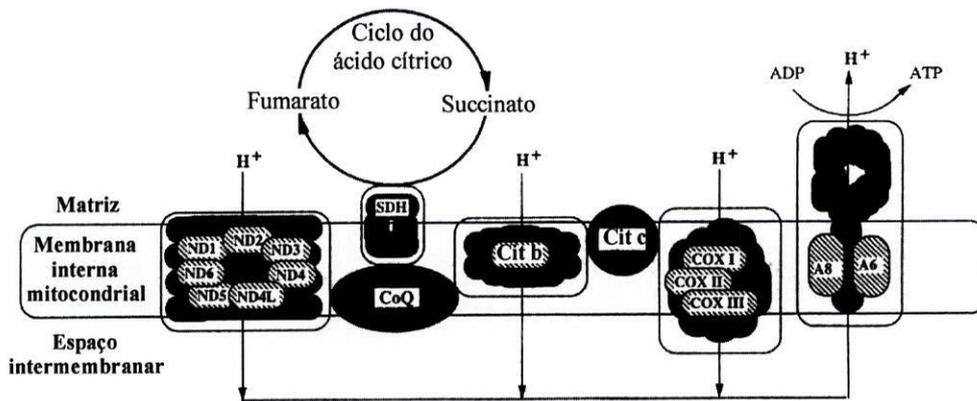


Figura 2-1. Representação esquemática da molécula do mtDNA e da localização das mutações patogênicas associadas a determinados síndromes. As diferentes áreas sombreadas representam os genes estruturais das sete subunidades do complexo I (ND), as três subunidades da citocromo oxidase (COX), citocromo b (cit b) e as duas subunidades da ATP sintetase (ATPase 6 e 8). Os rRNAs 12S e 16S, estão preenchidos a negro e os 22 tRNAs são representados por uma única letra relativa aos aminoácidos correspondentes.

Abreviaturas: LHON, neuropatia óptica de Leber; NARP, neuropatia, ataxia e retinite pigmentar; MILS, síndrome de Leigh de hereditariedade materna; FBSN, necrose estriatal bilateral familiar; MERRF, epilepsia mioclônica com RRFs; PEO, oftalmoplegia externa progressiva; MELAS, encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios *stroke-like*; KSS síndrome de Kearns-Sayer, (adaptado de DiMauro *et al*, 1999).

localização das mutações patogénicas associadas a determinados síndromes. É de salientar que mais de 100 polipeptídeos estão implicados na biogénese do sistema CR/OXPHOS, constituindo as subunidades dos cinco complexos daquele sistema (Figura 2-2), onde podemos inferir que a maior parte destes genes estão localizados ao nível da nDNA.

Neste capítulo apresentamos os resultados da investigação molecular do mtDNA de 102 doentes com suspeita de défice da CRM, após uma abordagem multidisciplinar: clínica, imagiológica, bioquímica e miopatológica. Com base nos nossos dados, podemos confirmar a alta frequência de deleções na PEO, das mutações pontuais na doença de Leigh e de todas as mutações mais comuns associadas a este genoma. Este estudo a nível nacional permitiu uma caracterização molecular das citopatias mitocondriais na população portuguesa.



Subunidades	Complexo I	Complexo II	Complexo III	Complexo IV	Complexo V
Codificadas pelo nDNA	35	4	10	10	12
Codificadas pelo mtDNA	7	0	1	3	2

Figura 2-2. Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial. As subunidades codificadas pelo nDNA estão a sombreado e as subunidades codificadas pelo mtDNA a tracejado. Os prótons ( $H^+$ ) são bombeados da matriz para o espaço intermembranar através dos complexos I, III e IV. Posteriormente, são novamente transportados para a matriz através do complexo V, com uma produção concomitante de ATP. A ubiquinona (também chamada coenzima Q; CoQ) e o citocromo c (cit c) são proteínas que transportam electrões e são codificadas pelo nDNA (adaptado de DiMauro *et al*, 1999).

## 2.2 Doentes e métodos

### Doentes

Os doentes incluídos neste estudo foram provenientes de hospitais de todo o País e na sua maioria foram investigados sob o ponto de vista miopatológico na Unidade de Neuropatologia do HGSA.

O diagnóstico de défice da CRM foi baseado no fenótipo clínico, na presença de hiperlactacidemia nos exames laboratoriais, na observação de RRFs no exame histopatológico, no défice isolado ou combinado de complexos da CRM no estudo bioquímico, e/ou na identificação de uma mutação do mtDNA no estudo genético.

### Métodos

Em 102 doentes com défice da CRM foi efectuada a extracção de DNA total a partir (I) dos leucócitos (utilizando um *kit* comercial da *Quiagen*), (II) da fracção insolúvel dos homogeneizados das biópsias musculares obtida após centrifugação e/ou (III) cultura de fibroblastos (em ambos os casos pelo método convencional, *Zeviani et al*, 1998).

A investigação molecular do mtDNA foi efectuada através das técnicas de *Southern-blotting*, *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)* e sequenciação directa dos produtos de PCR.

A detecção de rearranjos, deleções e duplicações e a quantificação do mtDNA presente num determinado tecido (importante para o diagnóstico de situações de depleção em mtDNA), foram efectuadas através da metodologia de *Southern-blotting* (*Moraes et al*, 1993; *Cormier-Daire et al*, 1994).

***Southern-blotting*** - Três a cinco microgramas de DNA total muscular foram digeridos por uma das endonucleases de restrição, *PvuII* ou *BamHI* que linearizam a molécula circular de mtDNA (têm um único local de corte no mtDNA nt-2652 / nt-14258, respectivamente). Os fragmentos obtidos foram submetidos a uma electroforese (175V durante 5h) em gel de agarose a 0,8%, paralelamente com um marcador de peso molecular (*lambda/Hind III*). Posteriormente, o gel foi desnaturado, neutralizado e transferido para uma membrana de *nylon (Zeta-probe BioRad)*. Para hibridização utilizamos uma sonda de mtDNA total humano, marcada com [ $\alpha^{32}$ -P-dATP],  $1-2 \times 10^6$  cpm/ml, (preparada segundo protocolo da *Boehringer Mannheim-BM random primed*

*DNA labeling kit BM* e purificada com *Quick Spin columns, BM*). Seguidamente, a membrana foi então exposta a um filme fotográfico durante cerca de 4 horas, para assegurar que a hibridização das sequências presentes no genoma nuclear não interferisse com a análise do mtDNA.

As determinações densitométricas dos sinais de hibridização nas autorradiografias foram efectuadas usando um densitómetro (*Ultrascan Laser 2202 - LKB*).

Os casos positivos com deleção simples de grande tamanho, foram confirmados com a enzima *SnaBI* para a pesquisa de duplicações.

A pesquisa de depleção do mtDNA pode ser efectuada através de três métodos básicos: hibridização *blot*, hibridização *in situ* e imunocitoquímico.

A hibridização *Southern-blot* (Maniatis *et al*, 1982) permite a determinação dos níveis relativos de mtDNA usando sondas simultaneamente para o mtDNA e para o nDNA. Como o mtDNA está presente em múltiplas cópias, a utilização de uma única cópia de um gene nuclear como padrão interno é tecnicamente difícil. Para torneir este problema, usamos uma sonda que hibridiza com um gene nuclear presente em múltiplas cópias, o gene do rRNA ribossómico 18S (Schmickel *et al*, 1977). Esta metodologia foi descrita por vários autores (Moraes *et al*, 1991<sup>a</sup>; Arnaudo *et al*, 1991; Tritschler *et al*, 1992).

Para determinar a localização das deleções no mtDNA utilizou-se a técnica de PCR e vários pares de *primers* de acordo com o tamanho aproximado da deleção, (estimado através do método de *Southern-blotting*) e tendo em consideração que a maioria das deleções se encontram localizadas na região entre 6 e 16 Kb.

As deleções múltiplas podem não ser facilmente detectáveis através da técnica de *Southern-blotting* devido às suas reduzidas dimensões ou quantidade (Servidei *et al*, 1991) e por conseguinte fez-se a sua pesquisa também através da técnica de PCR.

**PCR/RFLP** - Para pesquisar as mutações pontuais mais comuns: A3243G; T3271C; A8344G; T8356C e T8993G através da análise de *RFLP* foram amplificadas por PCR regiões do mtDNA. Os *primers* e as condições de amplificação do mtDNA foram seleccionados de acordo com a sequência de *Cambridge* (Anderson *et al*, 1981) e

com o fragmento a amplificar. As sequências dos *primers* utilizados nas reacções de amplificação estão indicadas no Quadro 2-1.

Nas reacções de amplificação foram utilizados 100 µl de uma mistura com a seguinte composição: dNTPs 0,2 µM (*Pharmacia*), tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 1µM de cada oligonucleotídeo, DNA 1-2 µg, Taq DNA polimerase 1U (*Boehringer Mannheim*). A amostra foi sujeita a ciclos de temperaturas num termociclador Perkin Elmer, 2400.

Quadro 2-1 Sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos, para a pesquisa das mutações pontuais mais frequentes do mtDNA

Mutação pontual	Nome do <i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'→3')	Tamanho do fragmento
A3243G	Rsa 3123-F Rsa 3337-B	CCTCCCTGTACCAAAGGAC GCGATTAGAATGGGTACAATG	238 pb
T3271C	Stu 2172-F MELAS 3271-B	CCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCC GAGGAATTGAACCTCTGACTCTAA	1131 pb
A8344G	Bst 7973-F Ban 8344-B	CCCCATTATTCCTAGAACCAGGCG GGGGCATTTCCTACTGTAAAGAGGTGTGGG	417 pb
T8356C	Apa 8289-F MERRF 8356-B	CTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACC ATTTAGTTGGGGCATTTCACCTTA	141 pb
T8993G/C	Bst 7973-F Cox3 9950-B	CCCCATTATTCCTAGAACCAGGCG AACCACATCTACAAAATGCC	1995 pb

Abreviaturas: F- refere-se à sequência nucleotídica da cadeia orientada de 5'→3' e B- à sequência nucleotídica da cadeia complementar ; pb-pares de bases.

No Quadro 2-2 encontram-se resumidas as condições utilizadas na amplificação de cada um dos fragmentos.

Os fragmentos amplificados foram digeridos pela enzima respectiva durante 18h a 37°C. Na fase inicial deste estudo, os produtos da digestão enzimática foram separados por electroforese vertical, sendo posteriormente substituída por horizontal em gel de poliacrilamida [T=12%; C=3% e T=8%; C=3% (para a mutação T8993G); 110 x 105 x 0.5 mm], a 10°C, durante 2h com 18 volt/cm. Como eléctrodos foram utilizadas tiras de papel de filtro Whatman 17Chr embebidas em tampão das pontes, Tris-glicina

125 mM, pH 8.8 e utilizou-se o tampão Tris-HCl 375 mM, pH 8.8, como tampão do gel (Luís e Caeiro, 1995). O sistema utilizado foi o *Multiphor II* (*Pharmacia*) acoplado a um sistema de refrigeração. À solução electrolítica catódica foram adicionadas algumas gotas de um soluto de azul de bromofenol, de forma a que fosse possível controlar a “corrida” electroforética.

Quadro 2-2 Condições de amplificação e digestão dos fragmentos para pesquisa das mutações pontuais.

Mutação pontual	Condições de PCR	Enzima (endonuclease)	Fragmentos obtidos
<b>A3243G</b>	10 min. 94°C 1 min. 94°C 1 min. 55°C 45 seg. 72°C 15 min. 72°C	25 ciclos (1)	<i>HaeIII</i> Normal: 169, 37, 32 Mutado: 97, 72, 37, 32
<b>T3271C</b>	10 min. 94°C 1 min. 94°C 1 min. 55°C 2 min. 72°C 15 min. 72°C	25 ciclos	<i>DdeI</i> Normal: 692, 210, 126, 103 Mutado: 692, 210, 126, 79, 24
<b>A8344G</b>	10 min. 94°C 1 min. 94°C 2 min. 60°C 2 min. 72°C 15 min. 72°C	25 ciclos	<i>BanII</i> Normal: 298, 78, 41 Mutado: 298, 52, 41, 26
<b>T8356C</b>	10 min. 94°C 1 min. 94°C 1 min. 60°C 1 min. 72°C 15 min. 72°C	25 ciclos	<i>DraI</i> Normal: 119, 22 Mutado: 141
<b>T8993G</b> <b>T8993C</b>	10 min. 94°C 1 min. 94°C 2 min. 60°C 2 min. 72°C 15 min. 72°C	25 ciclos	<i>MspI</i> Normal: 1142, 658, 157, 38 Mutado: 842, 658, 300, 157, 38  <i>AvaI</i> Normal: 1995 Mutado: 1038, 957

(1) Programa utilizado para a pesquisa da mutação nt-3243 e também para amplificação dos tRNAs para posterior sequenciação.

Após a separação electroforética, as bandas correspondentes aos fragmentos de DNA foram visualizadas por coloração com nitrato de prata, de acordo com o protocolo (Budowle *et al.*, 1991). Nos casos positivos e nos estudos familiares procedeu-se à marcação radioactiva dos amplificados com  $^{32}\text{P}$  através da adição de 10  $\mu\text{Ci}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -

dATP e execução de apenas dois ciclos adicionais no termociclador para evitar a formação de heteroduplexes. Os produtos de amplificação foram digeridos com a enzima de restrição adequada à mutação a quantificar e migraram em gel vertical de poliacrilamida a 12% ou 8%, não desnaturante. Obtiveram-se autorradiografias por exposição do gel a um filme fotográfico (XAR-Kodak) à temperatura ambiente durante uma noite. A percentagem de mtDNA mutado foi determinada por densitometria num Phosphor-Imager (*Biorad, Hercules, CA*) e os resultados analisados pelo *software Image-Quant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)*.

Nalguns casos foram pesquisadas outras mutações pontuais do mtDNA de menor frequência, descritas na literatura, como estando associadas a apresentações clínicas semelhantes às dos doentes em estudo: síndrome de Leigh de transmissão materna (MILS)/neuropatia, ataxia e retinite pigmentar (NARP); encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios *stroke-like* (MELAS); surdez isolada ou induzida pelos aminoglicosídeos; neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON); cardiomiopatias e miopatias.

#### **Mutações associadas a MILS/ NARP**

Para além da mutação T8993G/C pesquisamos as seguintes mutações:

- T8851C.....localizada na ATPase 6.....(De Meirleir *et al*, 1994)
- T9176C.....localizada na ATPase 6.....(Thyagarajan *et al*, 1995)

#### **Mutações associadas ao MELAS**

Para além das mutações A3243G e T3271C pesquisamos as seguintes mutações:

- C3256T.....localizada no tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> .....(Morales *et al*, 1993)
- T3291C.....localizada no tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> .....(Goto *et al*, 1994)
- T5814C.....localizada no tRNA<sup>Cys</sup> .....(Manfredi *et al*, 1996)
- G13513A.....localizada no ND5.....(Santorelli *et al*, 1997)

#### **Mutação associada à surdez isolada ou induzida pelos aminoglicosídeos.**

- A1555G.....localizada no rRNA 12S.....(Prezant *et al*, 1993)

#### **Mutações associadas à neuropatia óptica de Leber (LHON)**

- G3460A.....localizada no ND1.....(Huoponen *et al*, 1991)

- G11778A.....localizada no ND4 .....(Wallace *et al*, 1988)
- T14484C.....localizada no ND6.....(Johns *et al*, 1992)
- G15257A.....localizada no Cit *b*.....(Johns *et Neufeld*, 1991)

#### Mutações associadas às cardiomiopatias

- A3260G.....localizada no tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> .....(Zeviani *et al*, 1991)
- C3303T.....localizada no tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> .....(Silvestri *et al*, 1993)
- T9997C.....localizada no tRNA<sup>Gly</sup> .....(Merante *et al*, 1994)

#### Mutações associadas às miopatias

- T3250C.....localizada no tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> .....(Goto *et al*, 1992)
- A3302G.....localizada no tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> .....(Bindoff *et al*, 1993)

A pesquisa destas mutações foi efectuada segundo as condições referidas no Quadro 2-3.

#### Pesquisa da deleção comum por PCR

Esta técnica pode ser utilizada na pesquisa da deleção comum, dado o tamanho e a localização serem constantes, ou na confirmação do resultado obtido por *Southern-blotting*. A deleção comum foi comprovada através da amplificação por PCR de uma região de 5447pb, que compreende a região mutada da molécula entre os nucleótidos 8483 e 13460 e que inclui os genes a seguir discriminados: subunidade 6 e parte da subunidade 8 da ATP sintetase (ATPase 8/6); subunidade III da citocromo oxidase (COX III); subunidades 3, 4L, 4 e parte da subunidade 5 da NADH coenzima Q redutase (ND3; ND4L/4; ND5).

*Primers* para pesquisa ou confirmação da deleção mais comum:

Xba 8,2-F (5' - 8273) - CCCCTCTACCCCCTCTAGAGCCCCTGTAAAGC

Stu 13,7B (5' - 13720) - GGCTTCCGGCTGCCAGGCCTTTAATGGG

Fok 13,7B (5' - 13750) - GTTGTTAGTAATGAGAAATTCTGCG

Quadro 2-3 Condições e *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos, para a pesquisa das mutações pontuais menos frequentes do mtDNA.

Mutação pontual	Nome do <i>Primer</i>	Tamanho do fragmento pb	Programa do termociclador	Enzimas de restrição	Fragmentos pb
T8851C	8829F Apa9265B	450	A	<i>RsaI</i>	N-280, 170 M-280, 148, 22
T9176C	8896F 9203B	308	A	<i>ScrFI</i>	N-211, 97 M-184, 97, 27
C3256T	SuppeF Rsa3337B	123	B	<i>HinPI</i>	N-99, 13, 11 M-110, 13
T3291C	3290B FokI4237B	1086	C	<i>DpnII</i>	N-658, 394, 34 M-658, 370, 34, 24
T5814C	HpaI5685F Hha5971B	297	B	<i>HphI</i>	N-121, 98, 78 M- 199, 98
G13513A	13491F 13610B	119	B	<i>BbsI</i>	N-92, 27 M-119
A1555G	1009F 1575B	566	B	<i>HaeIII</i>	N-455, 111 M-455, 91, 20
G3460A	Rsa3123F FokI4237B	1233	C	<i>Acyl</i>	N-889, 344 M-1233
G11778A	HindI1680F Hinc12406B	745	D	<i>SfaNI</i>	N-626, 119 M-745
T14484C	Sau14,4F RI14538B	755	E	<i>DpnII</i>	N-54, 21 M-75
G15257A	LHON15,2F LHON15,2B	149	D	<i>AccI</i>	N-82, 49, 18 M-131, 18
A3260G	Rsa3123F 3260B	166	B	<i>XmnI</i>	N-166 M-120, 46
C3303T	3303F Rsa3337B	76	B	<i>HpaI</i>	N-50, 26 M-76
T9997C	Asu9910F Xba10269B	367	B	<i>BgaI</i>	N-162, 128, 65, 12 M-162, 95, 65, 33, 12
T3250C	3250F 3423B	199	B	<i>NaeI</i>	N-199 M-177, 22
A3302G	3173F 3423B	191	B	<i>MseI</i>	N-124, 35, 32 M-159, 32

Abreviaturas: F refere-se à sequência nucleotídica da cadeia orientada de 5'→3'; B refere-se à sequência nucleotídica da cadeia complementar; pb pares de bases. programas (A) 94°-1', 60°-1', 72°-1'-25ciclos; (B) 94°-1', 55°-1', 72°-1'-25ciclos; (C) 94°-1', 55°-1', 72°-2'-25ciclos; (D) 94°-1', 60°-2', 72°-3'-30ciclos; (E) 94°-1', 50°-1', 72°-1'-25-ciclos; N-normal; M-mutado.

Os produtos amplificados foram testados num gel de agarose a 1% em TAE paralelamente com o marcador PhiX 174, (*Biolabs*). Os casos positivos apresentam uma banda de 470 pb (com Stu 13,7B) ou 500 pb (com Fok 13,7B) enquanto que os casos negativos não amplificam ou se o fazem é de um modo inespecífico.

### **Pesquisa de deleções múltiplas por PCR**

A pesquisa de deleções múltiplas fez-se através da técnica de PCR (Wong *et al*, 1997) com diferentes pares de *primers*. A metodologia é semelhante à utilizada para delimitar as deleções simples na molécula do mtDNA. Utilizaram-se os seguintes *primers*:

Bst 7973F (5'-7955) – CCCCCATTATTCCTAGAACCAGGCG;

Mbo 15591B (5'- 15600) - GGGACGGATCGGAGAATTGTGTAGGCG;

Kpn 16048B (5'- 16060) – CTTGGGTGGTACCCAAATCTGTTCCCC.

As condições de amplificação foram as seguintes: 94°C 1 min.; 60°C 1 min.; 72°C 1 min. durante 25 ciclos. Os produtos amplificados foram separados por electroforese num gel de agarose a 1%. Os resultados são posteriormente confirmados com outros grupos de *primers*, seleccionados de acordo com os fragmentos obtidos.

### **Pesquisa de deleções por PCR-longo**

A técnica do PCR-longo foi utilizada neste trabalho unicamente na preparação de sondas para o método de *Southern-blotting*. Há, no entanto, vários grupos que a utiliza no rastreio de deleções (Ferlin *et al*. 1997), dado ser uma técnica bastante rápida quando comparada com a do *Southern-blotting* e amplificar fragmentos com tamanho superior a 3 Kb, contrariamente à reacção convencional de PCR .

**Localização das deleções** - Para proceder a uma correcta localização das deleções na molécula do mtDNA e excluir amplificações inespecíficas obtidas por PCR foi utilizado o método *primer shifting*. O DNA dos doentes foi amplificado utilizando os seguintes pares de *primers* (5'-3'): (1) 7433-7468 F e 16060-16033 B; (2) 7433-7468 F e 15600-15574 B; (3) 7433-7468 F e 14967-14944 B; (4) 7433-7468 F e 13720-13692 B; (5) 7433-7468 F e 12653-12629 B; (6) 8983 -9006 F e 16060-16033 B; (7) 10354-10377 F e 16060-16033 B; (8) 12106-12128 F e 16060-16033 B (Anexo V).

As condições de PCR utilizadas foram: 94°C - 1min, 60°C - 2min, 72°C - 3min durante 25 ciclos. Os produtos amplificados foram separados por electroforese num gel de agarose a 1%. Posteriormente estes produtos de PCR foram sequenciados.

**Sequenciação directa dos produtos de PCR** - Neste estudo, a sequenciação do mtDNA (Houshmand *et al*, 1994) foi utilizada para:

1. confirmar as substituições nucleotídicas detectadas por ensaios de restrição;
2. confinar os limites das deleções identificadas por Southern-blot;
3. confirmar e localizar as deleções múltiplas;
4. verificar se vários indivíduos com a mesma mutação pertencem ao mesmo haplogrupo (sequenciação da região HVR1 do D-Loop);
5. pesquisar mutações novas nos genes que codificam os 22 tRNAs (dos doentes que evidenciaram RRFs no estudo histopatológico, por corresponderem aos que têm maior probabilidade de serem portadores de mutações no mtDNA).

*Procedimento:* A sequenciação automática foi efectuada num aparelho *ABI PRISM 310 (Applied Biosystems)*. A preparação da amostra para sequenciação automática inicia-se pela realização de uma PCR simétrica. No Quadro 2-4 estão indicados os *primers* utilizados nas reacções de amplificação dos vários tRNAs. O programa do termociclador escolhido foi o já referido para a pesquisa da mutação nt-3243 no Quadro 2-2.

As amostras purificadas foram submetidas a sequenciação cíclica, utilizando-se uma mistura reaccional comercial (*Perkin-Elmer, Applied Biosystems*) que possui os 4 dNTPs marcados com fluorocromos distintos, tampão e uma DNA-polimerase. Para efectuar a reacção de alongamento foi necessário adicionar 4 a 8 µl desta mistura, o amplificado purificado (0,5-8µl), uma das cadeias oligonucleotídicas de iniciação (3,2 pmol) e água (até perfazer o volume de 20 µl). O programa do termociclador utilizado foi: 4' - 96°C seguido de 25 ciclos de 10'' - 96°C; 5'' - 55°C; 4' - 60°C e finalmente 10' - 60°C. Os fragmentos sintetizados (produtos da PCR assimétrica) foram purificados por precipitação com etanol a 90% frio e MgCl<sub>2</sub> 2mM (na proporção de 20: 110: 38), seguida de centrifugação a 10.000 rpm, durante 30 min., lavagem com etanol a 70% frio (-20°C), nova centrifugação, decantação e secagem (à temperatura ambiente). Uma vez secas, as amostras foram conservadas a -20°C até se proceder à sua análise. A preparação final para injeccção no *ABI PRISM* envolveu a recuperação do precipitado

com 25µl de uma mistura com características desnaturantes e elevada viscosidade (*Perkin-Elmer, Applied Biosystems*) e desnaturação a 94°C, durante 5 minutos.

Quadro 2-4 *Primers* utilizados na sequenciação dos tRNAs.

tRNA	Nome do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'→3')	Tamanho do fragmento (pb)
Phe	Bal 321F NlaIII 694B	CCCCGCTTCTGGCCACAGCAC ATGCTTGCATGTGTAATCTTAC	313
Val	Apa 1462F Hha 1768B	CAGGGCCCTGAAGCGGTACAC CTATTGCGCCAGGTTTCAATTC	316
Leu <sup>(UUR)</sup>	Rsa 3123F Rsa 3337B	CCTCCCTGTACCAAAGGAC GCGATTAGAATGGGTACAATG	237
Ile-Gln-Met	Mae 4198F HaeII 4529B	CCTACCACTCACCTAGCATTAC GTGCGAGCTTAGCGCTGTGATG	359
Trp-Ala-Asu Cys-Tyr	HpaI 5685F Hha 5971B	CACTTAGTTAACAGCTAAGCACCC CAGCTCATGCGCCGAATAATAGG	297
Ser <sup>(UCN)</sup> -Asp	Xba 7440F Bcl 7657 B	CATAAAATCTAGACAAAAAAGGAAGGAAT CGAACCGAGGGCGTGATCATGAAAGGTG	236
Lys	Xba 8289F Stu 8571B	CCCCTTACCCCCCTCTAGAGCCCCTGTAA AGCGCGGGTAGGCCTAGGATTGTGG	329
Gly	Asu 9910F Xba 10256B	CTTTGGCTTCGAAGCCGCCCGGGCAATT TCTAGATCAAATAATAAGAAGG	367
Arg	Xba 10256F Spe 10526B	CCTTCTTATTATTTGATCTAGAAATTGCCC GTGAGCGATATACTAGTATTCCTAG	302
His-Ser <sup>(AGY)</sup> Leu <sup>(CUN)</sup>	Hpa 12123F Hinc 12406B	CAACCCCGACATCATTACCGGGT GGGTAAACGAGGGTGGTAAGG	307
Glu	Dde 14608F Taq 14803B	GAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCAC GGAGGTCGATGAATGAGTGG	209
Thr-Pro	Rsa 15812F Kpn 16048B	GTAGCATCCGTAATACTTAC CTTGGGTGGTACCCAAATCTGCTTCCCC	257

Cerca de 80% das mutações patogênicas descritas no mtDNA estão presentes nos tRNAs. A Figura 2-3 representa as regiões do tRNA funcionalmente importantes e onde já foram descritas mutações.

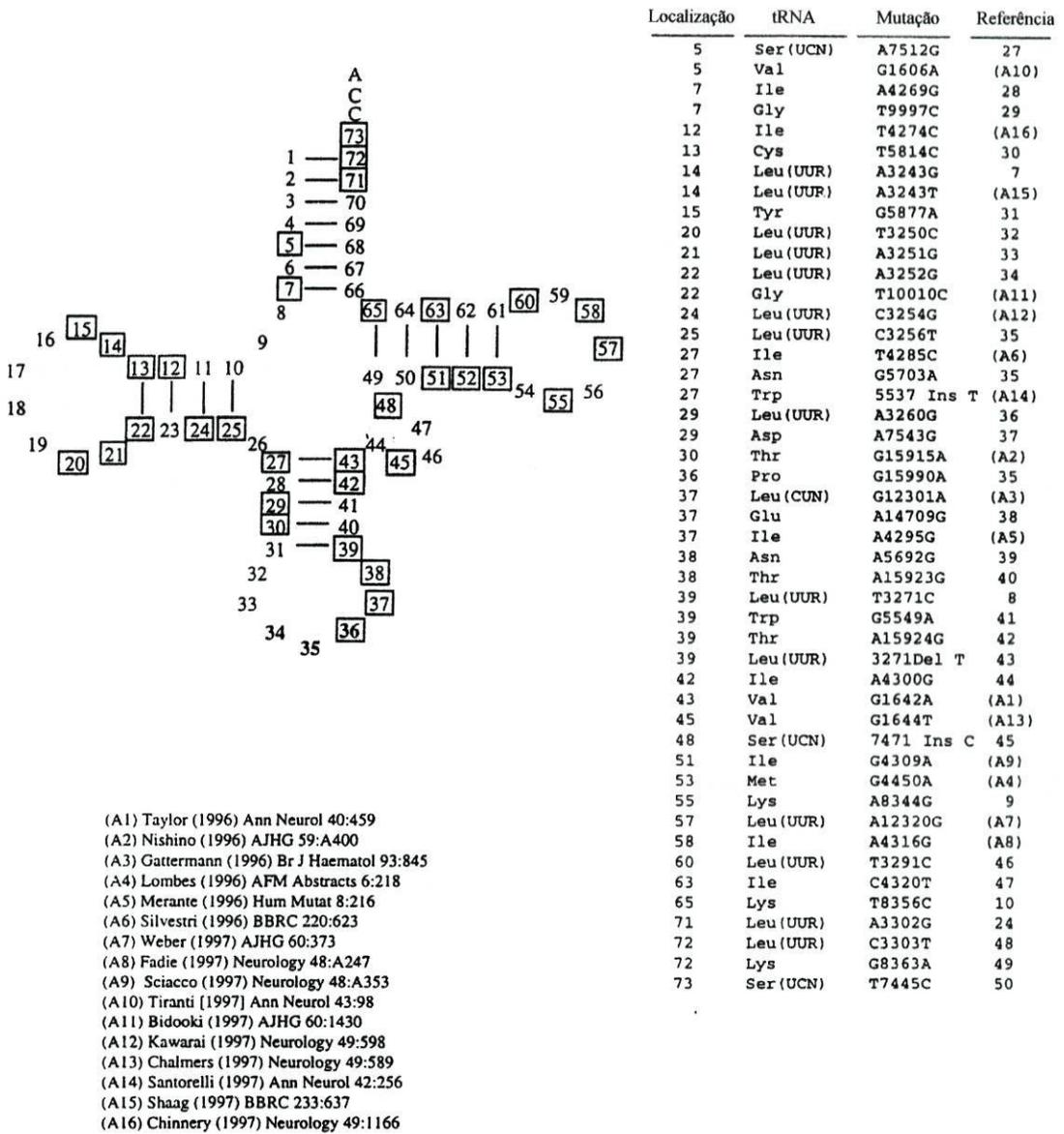


Figura 2-3 Representa as regiões do tRNA funcionalmente importantes e onde já foram descritas mutações. A localização referida no tabela da direita indica as posições das mutações do mtDNA no "trevo geral" dum gene de tRNA, (adaptado de Schon *et al*, 1989).

### Polimorfismos

Na sequência dos resultados obtidos na sequenciação dos tRNAs houve necessidade de, em três casos (G8519A, T3308C, A8248G) se proceder ao implemento das condições necessárias à sua pesquisa por PCR/RFLPs (Quadro 2-5).

Quadro 2-5 Condições de amplificação e digestão dos fragmentos para pesquisa das mutações pontuais G8519A, T3308C e A8348G.

Mutação pontual	Condições de PCR	Enzima (endonuclease)	Fragmentos obtidos (pb)	Primers
G8519A	10 min. 94°C 1min. 94°C 1min. 55°C 45 seg. 72°C 15 min. 72°C } 25 ciclos	<i>DdeI</i>	Normal: 246, 63 Mutado: 309	Xba 8289F Stu 8571B
T3308C	10 min. 94°C 1min. 94°C 1min. 55°C 2 min. 72°C 15 min. 72°C } 25 ciclos	<i>DraIII</i>	Normal: 226 Mutado: 195, 31	Melas 3116F Melas 3341B
A8348G	10 min. 94°C 1min. 94°C 2 min. 60°C 2 min. 72°C 15 min. 72°C } 25 ciclos	<i>HaeII</i>	Normal: 422 Mutado: 397, 25	Bst 7973F 8384B

## 2.3 Resultados e Discussão

Foram investigados 102 doentes de origem portuguesa, sendo 48 do sexo feminino e 54 do sexo masculino, com idades, à data da biópsia ou de colheita de sangue para análise, compreendidas entre 1 mês e 74 anos. Esta é uma amostra representativa dos défices da CRM, dado que é composta por uma população pediátrica e uma população adulta (com 47 e 55 indivíduos, respectivamente).

Neste estudo, foram encontrados em 50 doentes (49%) as mutações do mtDNA a seguir discriminadas: 27 doentes com deleções simples de grande tamanho, 6 doentes com deleções múltiplas, 1 doente com depleção e 16 doentes com mutações pontuais já descritas na literatura. Nos estudos familiares dos doentes com mutações pontuais, que envolveram 32 indivíduos da linha materna, foram identificados mais 14 indivíduos portadores de mutação (sintomáticos ou assintomáticos). Um estudo mais alargado destas famílias encontra-se em curso.

### Rearranjos do mtDNA

#### Deleções simples de grandes dimensões

Na análise molecular, do mtDNA do músculo esquelético dos doentes investigados, foram encontradas (através da técnica de *Southern-blotting* ou de PCR

específico para pesquisa da deleção comum), 27 deleções simples, cujos tamanhos variaram entre 2,4Kb e 7,6Kb (média: 5,3Kb), todas em heteroplasmia e com percentagens de DNA mutado entre 16 % e 98% (média: 55%).

Na Figura 2-4, estão representados cinco casos de deleções com diferentes tamanhos e distintas percentagens de mtDNA mutado, detectados através da técnica de *Southern-blotting* e na Figura 2-5, está representado um gel onde pode ser visualizado um caso positivo de pesquisa/confirmação da deleção comum (4977pb) por PCR.



Figura 2-4 Autorradiografia representativa de cinco casos de deleções do mtDNA de diferentes tamanhos. As amostras 1, 4, 6, 8 e 9 correspondem aos D19, D23, D24, D30 e D32; C é o controle normal. A molécula do mtDNA "normal" tem um tamanho de 16,5 Kb, estando também referido o tamanho das moléculas mutadas.

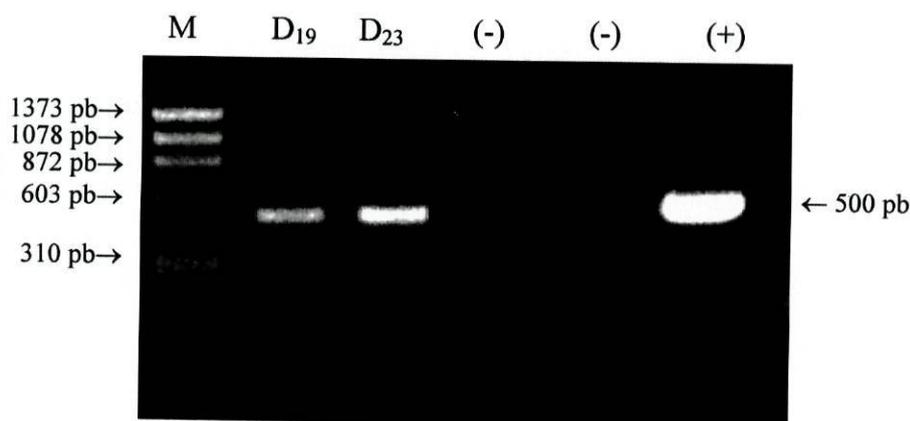


Figura 2-5 Imagem de um gel de pesquisa da deleção comum de 4977 pb, por PCR. Amplificou-se um fragmento de 500 pb (*primers*: Xba 8,2F e Fok 13,7B) nos casos positivos (D19, D23). Nos casos negativos (-) não há amplificação; (M) marcador.

As deleções presentes nos 27 doentes com idades compreendidas entre os 7 e os 69 anos (média: 31 anos), encontram-se discriminadas no Quadro 2-6.

Quadro 2-6 Deleções simples de grandes dimensões, detectadas no músculo de 27 dos 102 doentes deste estudo.

Doente	Idade à biópsia anos / sexo	Fenótipo Clínico	Tamanho da deleção (Kb)	Percentagem de deleção no músculo
D1	45 / F	PEO/Neuropatia	2,4	80
D19	34 / F	PEO/Miopatia	4,9	49
D4	69 / F	PEO	7,6	18
D23	33 / M	PEO/Miopatia	4,9	85
D31	17 / M	KSS incompleto	4,9	56
D27	29 / M	PEO	4,9	50
D30	37 / F	PEO	7,6	33
D32	43 / F	PEO/Miopatia	2,7	48
D24	8 / M	S. Leigh-like	4,9	61
D43	12 / F	KSS	7,6	16
D39	17 / F	PEO/Encefalopatia	4,9	55
D61	31 / M	PEO	7,6	22
D68	7 / M	Atingimento multissistémico (a)	7,6	52
D42	24 / F	PEO/Miopatia	4,9	61
D96	47 / F	PEO	4,9	24
D80	23 / F	Miopatia	4,9	26
D84	26 / F	PEO	2,4	91
D94	41 / M	Miopatia	4,9	59
D95	21 / M	KSS	5,6	92
D45	69 / F	PEO	4,9	60
D93	32 / M	PEO	4,9	75
D62	68 / M	PEO	4,9	55
D16	33 / F	PEO/disfagia/paresia facial oculo-faríngea	4,9	98
D77	13 / F	KSS	4,9	81
D65	24 / F	PEO	7,6	28
D40	24 / M	KSS	4,9	16 (b)
D66	18 / F	PEO	5,1	87

Abreviaturas: PEO-oftalmoplegia externa progressiva; KSS-Síndrome de Kearns-Sayer;  
(a) Miopatia, encefalopatia, baixa estatura, problemas de visão e malformações;  
(b) Estudo efectuado no sangue.

A deleção mais comum, de 4.977 Kb, estende-se da região do gene ATPase 8 ao gene ND5 (Moraes *et al*, 1989; Holt *et al*, 1989; Johns *et al*, 1989; Tanaka *et al*, 1989) e esteve presente em 59% (16/27) do número total de deleções. Esta deleção é limitada por uma repetição de 13pb (Schon *et al*, 1989).

Todas as deleções identificadas têm repetições associadas e confinam-se à mesma região do mtDNA como comprova a Figura 2-6. De acordo com a literatura, e salvo raros casos (Miyabayashi *et al*, 1991; Ballinger *et al*, 1992), as deleções não removem as regiões do mtDNA  $O_H$  ou  $O_L$  correspondentes às origens de replicação do mtDNA.

A localização e o tamanho aproximado das diferentes deleções simples, referenciados à molécula de mtDNA linearizada, estão representados na Figura 2-6.

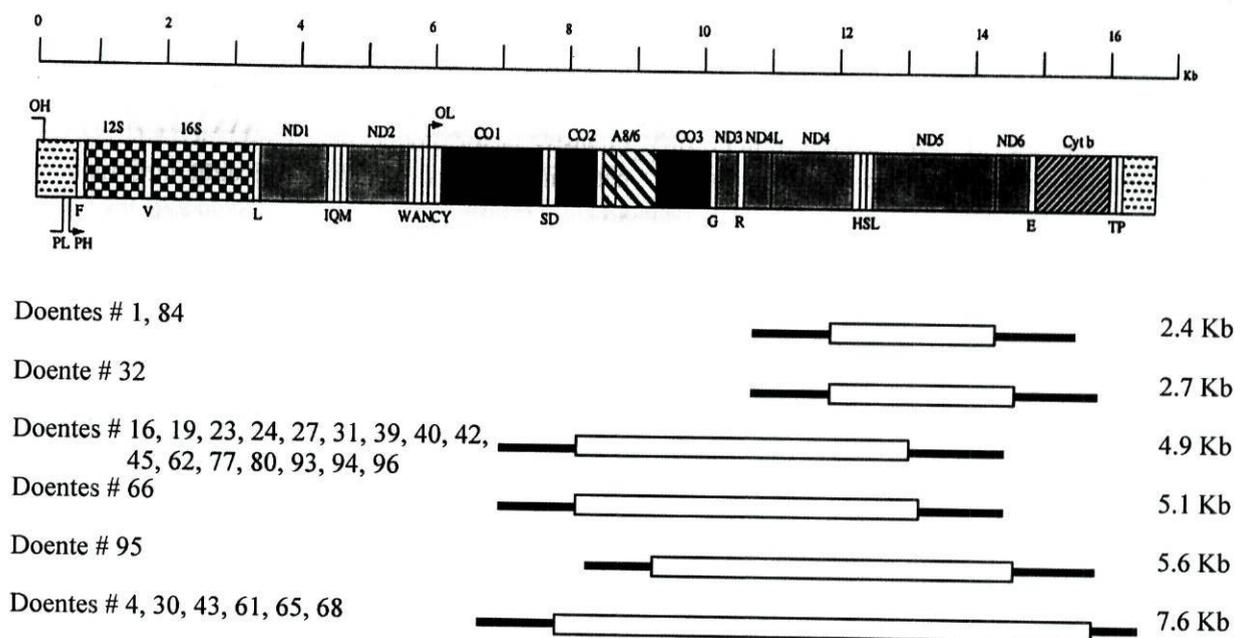


Figura 2-6 Representação da localização das diferentes deleções do mtDNA deste estudo.

Foi tentada uma correlação entre as dimensões das deleções encontradas e o valor percentual de cada uma delas no tecido estudado (músculo) Figura 2-7. No entanto, não se conseguiu estabelecer qualquer relação entre o fenótipo clínico e as características das deleções (tamanho, localização e percentagem).

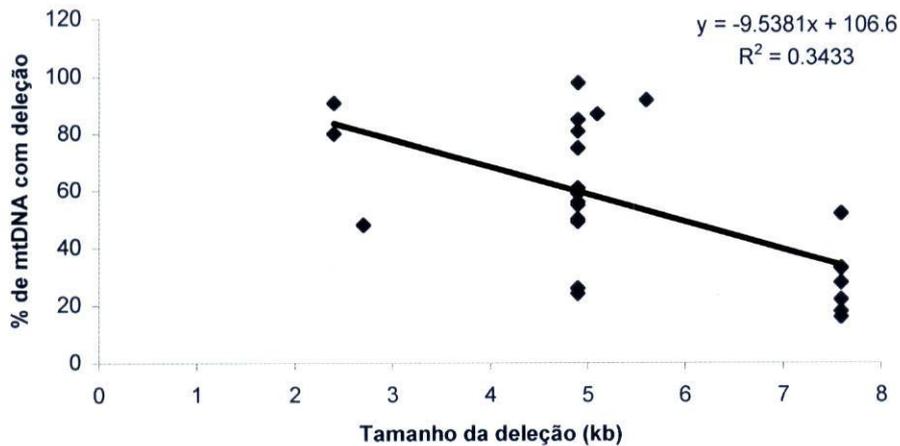


Figura 2-7 Correlação entre a percentagem de mtDNA com deleção e o tamanho da deleção.

Considerando que as deleções em geral têm carácter esporádico e que as histórias familiares da linha materna eram negativas, as famílias dos doentes não foram investigadas porque os indivíduos eram assintomáticos e seria necessário, efectuar biópsias musculares.

Os três grandes síndromes que estão frequentemente associados a deleções são: PEO esporádica com RRFs, o KSS e o síndrome de Pearson. Embora sob o ponto de vista genético e de patogénese, estes sejam semelhantes, a distribuição das deleções pelos tecidos diferencia estes síndromes.

Nos 102 doentes, a PEO isolada ou como parte integrante de uma doença multissistémica, foi um dos principais fenótipos clínicos estudados, sempre associado a RRFs e fibras COX negativas, o que justifica o número significativo de deleções encontradas. Dos 27 doentes que revelaram deleções simples de grande tamanho, 62% (17/27) apresentavam um fenótipo clínico de PEO e 18% (5/27) o de KSS.

Dos 32 doentes com PEO 17 apresentaram deleções simples de grandes dimensões (53%). Este dado está de acordo com a literatura, em que só cerca de 50% dos doentes com PEO têm deleções no mtDNA (Moraes *et al*, 1989).

Os casos de KSS incompleto, como o D31 que na altura do diagnóstico não apresentava bloqueio cardíaco, síndrome cerebeloso ou proteinorraquia superior a 100mg/dL podem mais tarde evoluir para um fenótipo mais grave (Moraes *et al*, 1989).

De um modo geral, nas miopatias mitocondrias e em certos casos de KSS, as deleções só estão presentes no músculo e, em menor quantidade, nos leucócitos (D40 do Quadro 2-5). Pelo contrário, no síndrome de Pearson, as deleções já estão presentes em todos os tecidos, em altas percentagens, devido à natureza multissistémica deste síndrome. Há, por conseguinte, diferenças significativas na proporção relativa dos genomas deletados nos diferentes tecidos, mas pequena variação entre diferentes áreas do mesmo tecido.

Neste estudo, não foi identificado nenhum caso de síndrome de Pearson, doença não-neurológica da criança, que se caracteriza por uma anemia sideroblástica, vacualização dos percursoros medulares e disfunção do pâncreas exócrino, provavelmente porque o número de crianças investigadas não foi muito elevado e a sua apresentação clínica não ser sugestiva de doença mitocondrial. Em alguns casos descritos, a única alteração encontrada foi uma anemia sideroblástica (Rötig *et al*, 1990), podendo este tipo de diagnóstico não ser equacionado nesta situação.

### ***Duplicações do mtDNA***

Em todos os casos positivos para deleções do mtDNA, procedeu-se à pesquisa de duplicações que se revelou negativa.

### ***Depleção do mtDNA***

A depleção do mtDNA é a primeira doença humana hereditária, caracterizada por uma redução quantitativa do nível do mtDNA qualitativamente normal, relativamente ao nDNA. É devida a uma mutação no(s) gene(s) que codifica(m) as proteínas necessárias para a replicação do mtDNA, o que leva a uma redução dramática na quantidade de mtDNA, nos tecidos afectados (Morales *et al*, 1991).

No D2, uma criança de 16 meses com encefalopatia, cataratas e atingimento hepático ligeiro, foi detectado a nível bioquímico uma hiperlactacidemia persistente (4,5 mmol/L) e um défice múltiplo dos complexos da CRM. A nível molecular, verificou-se uma redução significativa (70%) da quantidade de mtDNA muscular (Figura 2-8).

Não foi disponibilizado tecido hepático para confirmação deste resultado, nem efectuada análise de imunocitoquímica com anticorpos anti-DNA para hibridização *in situ*. Os fibroblastos do doente também não foram testados, embora raramente esta linha celular revele a depleção (Poulton *et al*, 1994).

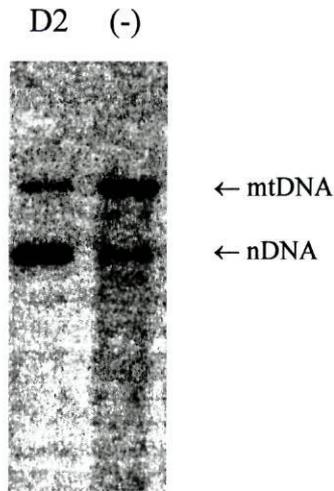


Figura 2-8 Representação da depleção do mtDNA muscular em relação ao nDNA do D2 e comparação com um controlo normal (-).

### *Deleções múltiplas do mtDNA*

Em todos os doentes, com PEO e RRFs, em que não foram identificadas deleções simples, procedemos à pesquisa de deleções múltiplas (Figura 2-9).

Foram encontrados seis doentes com deleções múltiplas (Quadro 2-7), com fenótipos clínicos distintos, o que demonstra a heterogeneidade clínica associada a este genótipo que é composto por deleções de diferentes tamanhos e número, conforme os casos. Os fenótipos associados às deleções múltiplas incluíram: um caso de MNGIE, D78, que apresentava uma neuropatia periférica e uma pseudo-obstrução gastrointestinal e cuja investigação familiar revelou um irmão clinicamente igual, numa família de sete irmãos que está a ser investigada, mas que confirma o carácter autossómico recessivo desta doença; um caso de miosite de corpos de inclusão esporádica, D58; uma PEO associada a fraqueza muscular, como nos D89 e D49 e um caso de PEO familiar e cardiomiopatia hipertrófica no D85, em que a história familiar sugere uma hereditariedade autossómica recessiva.

Todos os doentes eram normais ao nascimento e durante a primeira infância, o que sugere que as deleções se acumulam em tecidos pós-mitóticos.

A patogenicidade das deleções múltiplas tem sido questionada, especialmente nos doentes com idades mais avançadas como o D53, em que a deleção pode ser uma consequência da idade do doente e em que foi impossível efectuar uma avaliação familiar.

M1 M2 1 2 3

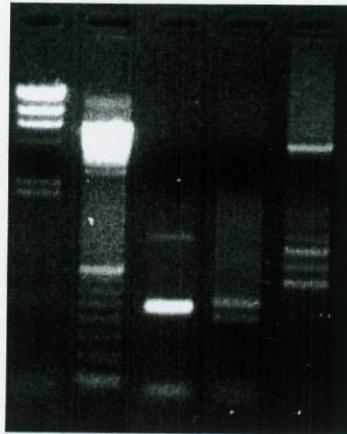


Figura 2-9 Representação das deleções múltiplas do D78, num gel de agarose a 1%. M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> são marcadores de peso molecular conhecido. As bandas das filas 1, 2 e 3 foram obtidas com os primers: 1- Xba 8,2F e Fok 13,7B (deleção comum); 2- Xba 10,2F e Kpn 16,0B; 3- ND2 5,4F e Apa 9,2B.

Quadro 2-7 Características clínicas, morfológicas e moleculares dos seis doentes com deleções múltiplas.

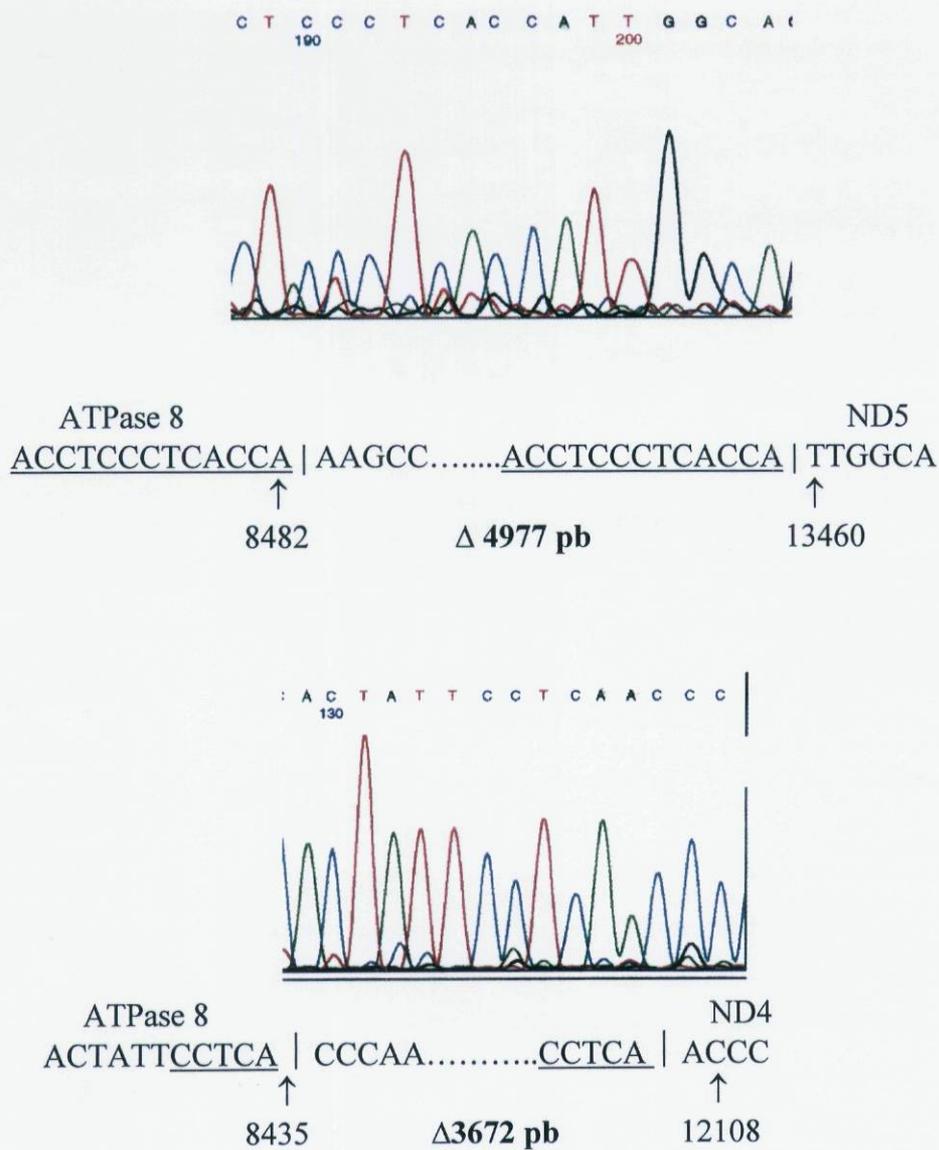
Doente	Idade à biópsia (anos) / sexo	Fenótipo clínico	Miopatologia	Deleções múltiplas do mtDNA (dimensões)*
D85	8 / M	PEO familiar	SDH, Inclusões paracristalinas	- 5142pb - 5767pb
D58	45 / F	Miopatia	Miosite de corpos de inclusão	- 3121pb - 3981pb - 4977pb
D89	46 / F	PEO / fadiga fácil e dores musculares	RRFs (++)	- 5189pb - 5789pb
D78	32 / F	MNGIE	RRFs (+++)	- 3672pb - 4135pb - 4977pb
D49	46 / F	PEO / fraqueza muscular	RRFs (+++)	- 4977pb - 5269pb - 5373pb
D53	71 / M	PEO	RRFs (++)	- 4189pb - 5789pb

\* O tamanho das deleções identificadas foi determinado por sequenciação do mtDNA.

Nas PEO autossómicas recessivas, a idade de início dos sintomas é mais precoce (Carozzo *et al*, 1998), o que é uma característica comum das doenças autossómicas recessivas. Nas PEO autossómicas dominantes, a fraqueza, que afecta os músculos dos membros e extraoculares, tem início na idade adulta. Os doentes em que foram identificadas deleções múltiplas, apresentavam RRFs e fibras COX negativas nos estudos miopatológicos, à excepção do D85 que revelou uma hiperactividade da SDH,

indicando uma proliferação mitocondrial e na microscopia electrónica inclusões paracristalinas.

Em todas as deleções foi comprovada a presença de uma sequência repetida nas suas extremidades, o que permite a junção das extremidades soltas após deleção. Nas deleções representadas na Figura 2-10, estão sublinhadas as repetições encontradas: na deleção de 4977pb (repetição de 13 pb), na deleção de 3672 pb (repetição de 5 pb) e na deleção de 4135pb (repetição de 5 pb).





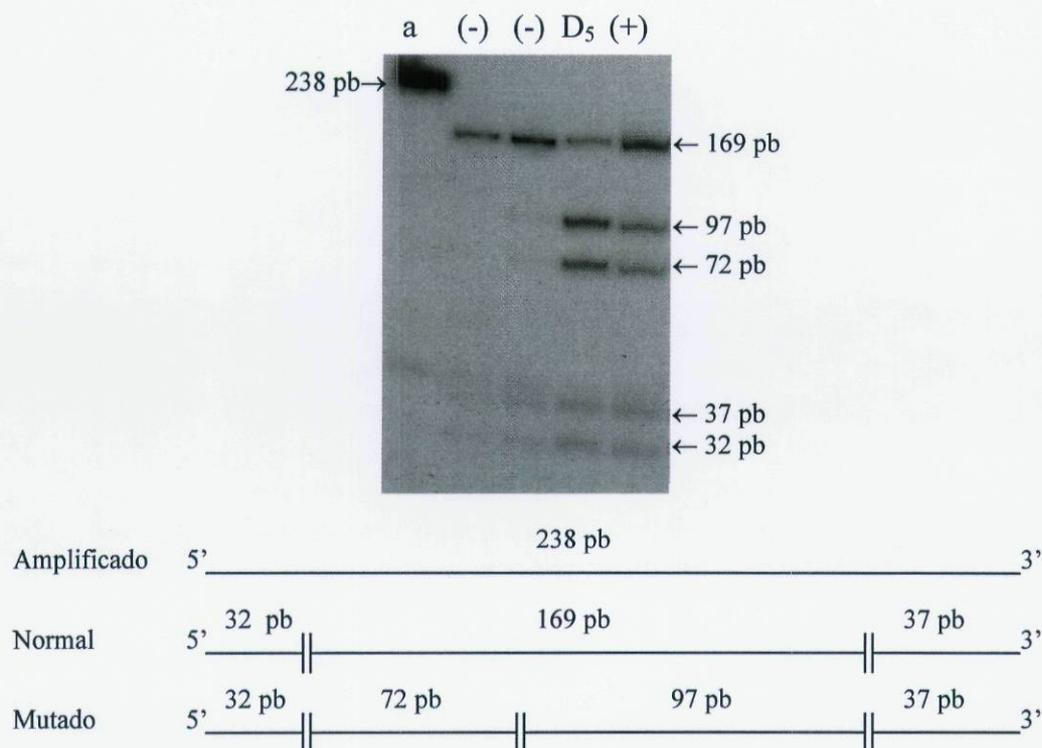


Figura 2-11 Em cima: Padrões electroforéticos dos fragmentos resultantes da digestão do produto amplificado com a enzima de restrição *HaeIII*. (a) produto amplificado e não digerido; (-) controlo negativo; D<sub>5</sub>-caso positivo; (+) controlo positivo. Em baixo: Diagrama que mostra a estratégia utilizada para testar a presença ou ausência de locais de restrição para a enzima *HaeIII*.

Os resultados do ensaio de restrição foram posteriormente confirmados por sequenciação automática do tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (Figura 2-12).

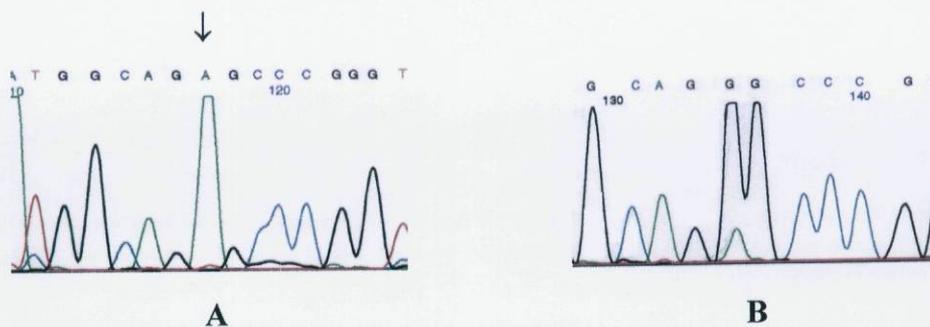


Figura 2-12 Parte da sequência do tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>; (A) representa um controlo normal e (B) o doente 5 com a mutação A3243G.

No Quadro 2-8 estão indicados resumidamente os dados clínicos, bioquímicos, morfológicos e de genética molecular dos seis probandos. Nestes doentes, e embora só três deles apresentassem um quadro típico de MELAS, foi tentada uma correlação entre a quantidade de mtDNA mutado e a idade de início da doença (Figura 2-13).

Quadro 2-8. Dados clínicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares dos seis doentes com a mutação A3243G.

	D5 Família A	D29 Família B	D38 Família C	D72 Família D	D101 Família E	D100 Família E
Fenótipo clínico	MELAS	CM	PEO-DM	SL	MELAS	MELAS
Sexo	M	M	F	M	F	F
Idade de início (anos)	6	3	Adolescência	5	7	20
Idade de diagnóstico (anos)	12	6	52	10	20	28
Intolerância ao exercício	+	+	-	+	+	-
Fraqueza muscular	+	-	+	-	+	-
PEO	-	-	+	-	-	-
Acidentes vasculares cerebrais	+	+	-		+	-
Convulsões	+	-	-	+	+	-
Náuseas, vômitos	+	+	-	+	+	-
Surdez	+	-	-	-	+	+
Cardiomiopatia	Hipertrófica	Dilatada	-	-	Hipertrófica	-
Pequena estatura	+	+	+	+	+	+
Ataxia	+	-	-	-	+	-
Diabetes mellitus	+	-	+	-	-	+
Dificuldades de aprendizagem	+	-	+	+	+	+
Outras manifestações	Anorexia Enxaqueca Escoliose	Anorexia	Diplopia Enxaqueca Retinopatia	Rigidez	Microcefalia Hirsutismo Dismorfias	-
% RRFs no músculo	25	20	2	3	10	20
Actividade enzimática residual dos complexos da CRM	I (10%); III (35%); IV (15%)	I (20%); III (22%); IV (12%)	Normal	I (9%); IV(11%)	n.d.	n. d.
% mtDNA mutado	78 (m)	88 (m); 68 (s)	65 (m)	82 (m); 54 (s)	79 (m)	67 (m); 20 (s)

Legenda: CM-cardiomiopatia; PEO-DM-(PEO-diabetes mellitus); SL-(síndrome de Leigh); (m)-músculo; (s)-sangue; n.d-(não determinado).

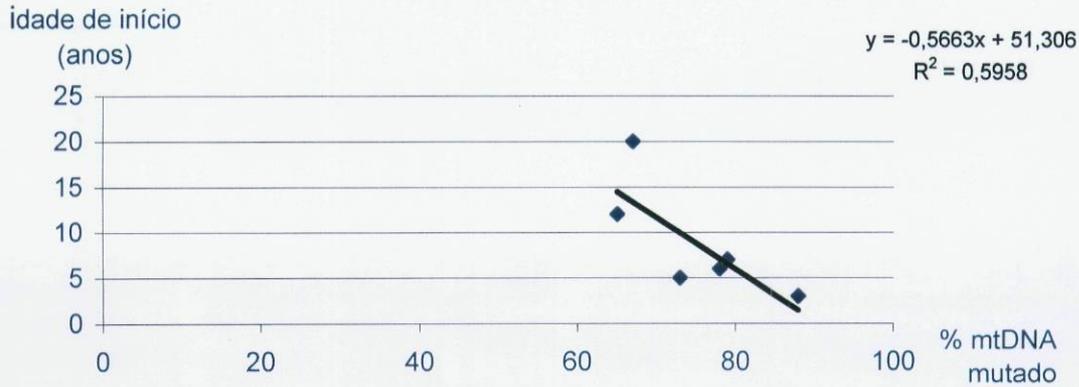


Figura 2-13 Correlação entre a percentagem de mutação pontual A3243G nos seis probandos e a idade de início da doença.

A quantidade de mtDNA mutado nos tecidos dos casos index variou entre 20% e 88% com um valor médio de 67%, sendo de  $76 \pm 9\%$  no músculo e  $47 \pm 25\%$  no sangue. A proporção de mtDNA mutado no sangue dos casos afectados e dos não afectados sobrepõe-se, o que limita a utilização deste dado para fins prognósticos.

Nos doentes estudados não houve relação entre o início dos sintomas e a percentagem do mtDNA mutado no músculo. Relativamente à apresentação clínica e à duração da doença não foi evidente qualquer relação com aquele parâmetro. Pelo contrário, a quantidade de mtDNA mutado no sangue estava relacionada com a gravidade da apresentação fenotípica e com a idade de início dos sintomas.

A análise de genética molecular do mtDNA de 20 membros da linha materna dos casos index (Figura 2-14) demonstrou que esta mutação também pode estar presente em indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos mas as percentagens dos genomas mutados são mais baixas. A presença de mtDNA mutado não é, por conseguinte, suficiente para originar uma disfunção mitocondrial, tem de exceder o limiar de expressão para ter expressão fenotípica. O limiar de expressão de uma determinada mutação do mtDNA pode ser determinada especificamente para cada família.

Dado que o número de moléculas mutadas no sangue é menor que no músculo (Ciafaloni *et al*, 1992), a mutação pode não ser detectável nas células sanguíneas de alguns doentes e ser detectável no músculo. O rastreio desta mutação no sangue é importante mas não absolutamente fiável.

A alta incidência das mutações encontradas no gene do tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> evidencia esta região como uma região *hot spot* nas doenças mitocondriais (Moraes *et al*, 1993).

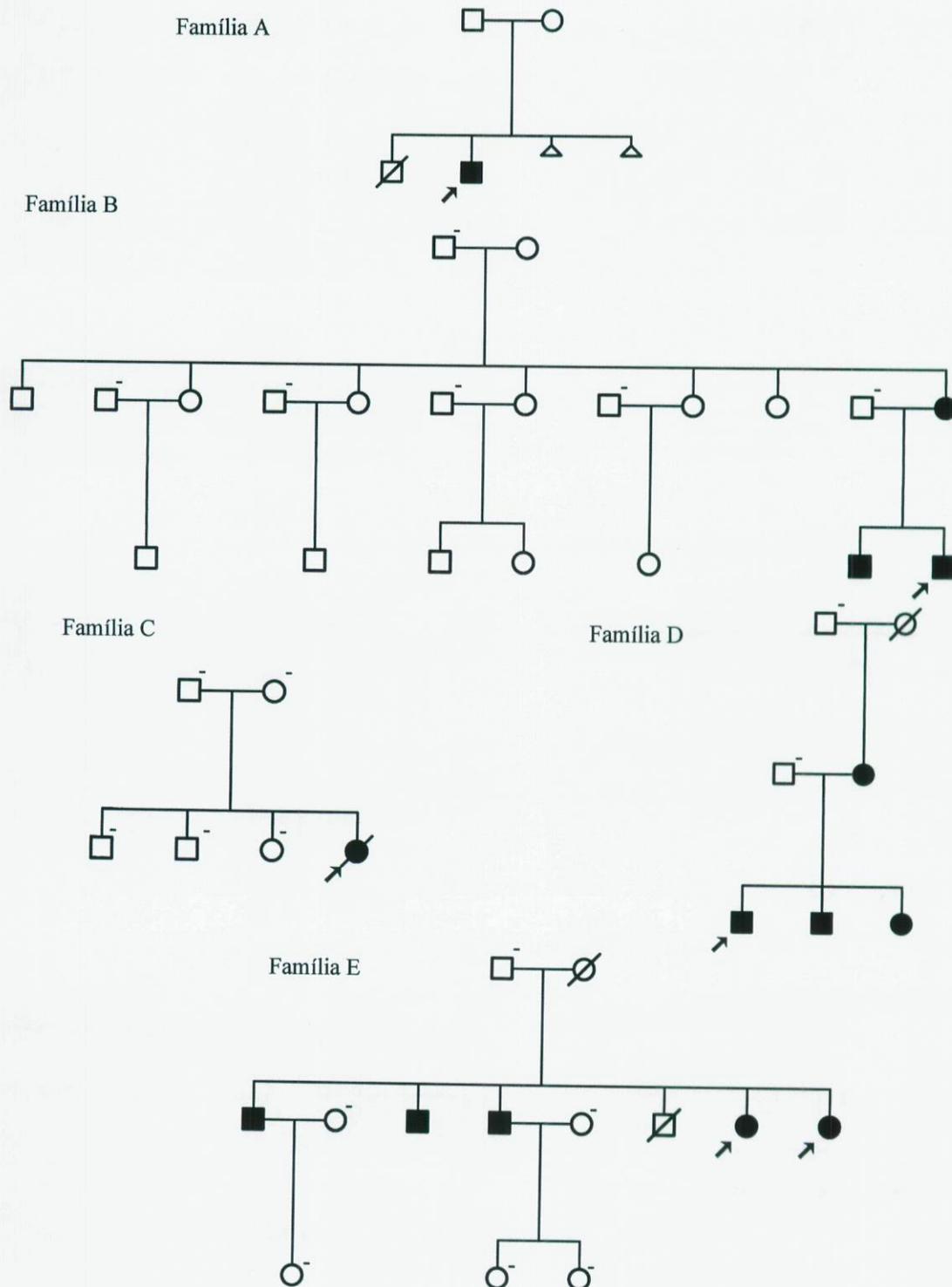


Figura 2-14 Árvores familiares das cinco famílias portadoras da mutação A3243G. Os símbolos preenchidos indicam os indivíduos portadores da mutação; os símbolos não preenchidos os casos negativos; o sinal negativo (-) indica que os indivíduos não foram estudados para esta mutação. As setas indicam os probandos.

**Mutação pontual A8344G**

A mutação A8344G foi detectada por ensaio de restrição (Figura 2-15) em dois doentes (D28 e D91), encontrando-se em grande quantidade tanto no músculo (>85%), como no sangue (>64%). No entanto, a gravidade dos respectivos quadros clínicos assim como a idade de início dos sintomas foram muito diferentes. De acordo com os casos referidos na literatura (Tanno *et al*, 1991; Seibel *et al*, 1991; Ozawa *et al*, 1995) não há uma relação entre a percentagem de mtDNA mutado e o fenótipo clínico.

A presença desta mutação foi confirmada por sequenciação do tRNA<sup>Lys</sup> (Figura 2-16).

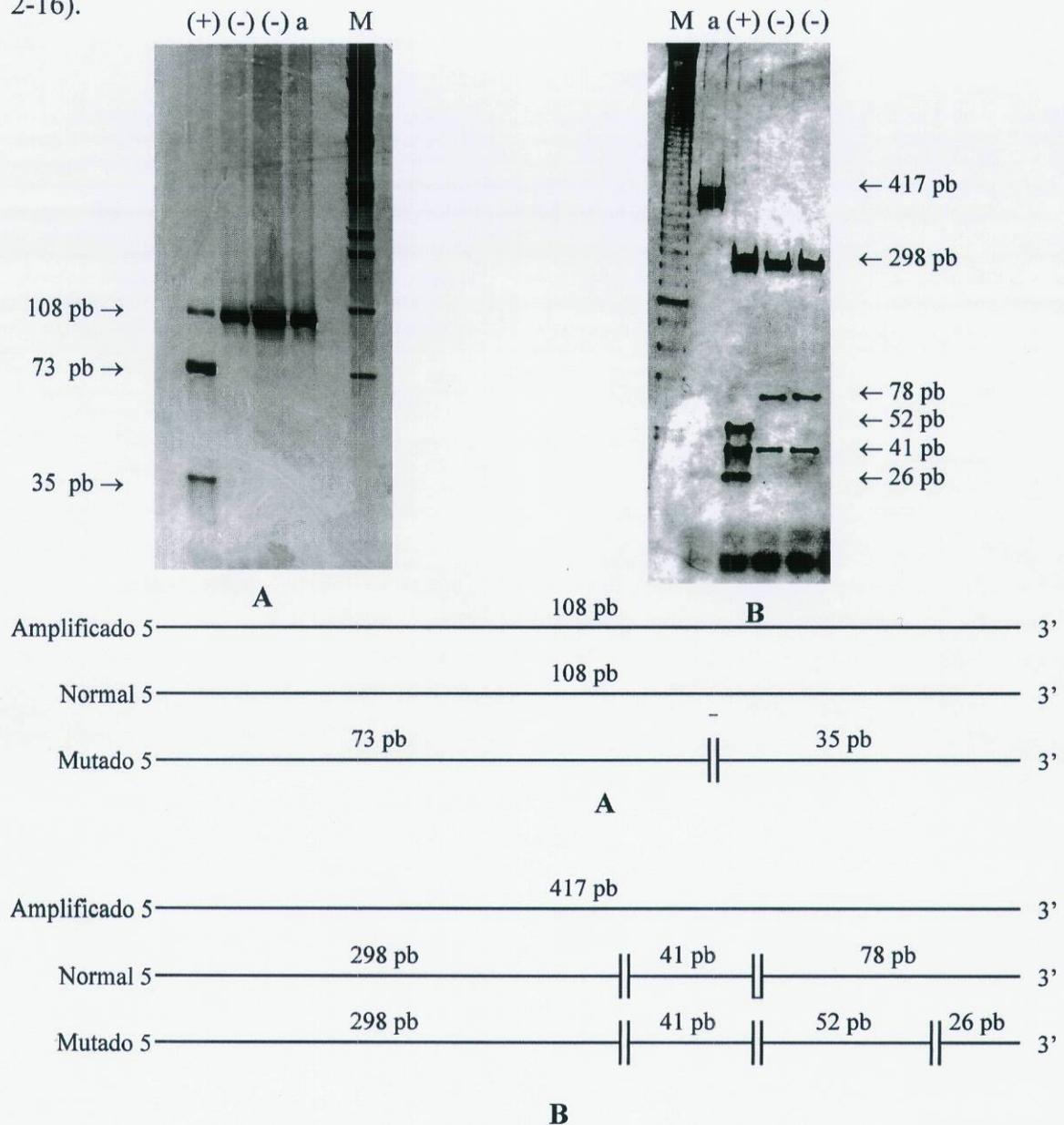


Figura 2-15 Detecção da mutação A8344G por PCR/RFLP; (a) fragmento amplificado não digerido; (+) controlo positivo; (-) controlo negativo e (M) marcador; (A) perfil obtido com as condições actuais (digestão com *BglI*) e (B) perfil obtido com as condições iniciais deste estudo (digestão com *BanII*).

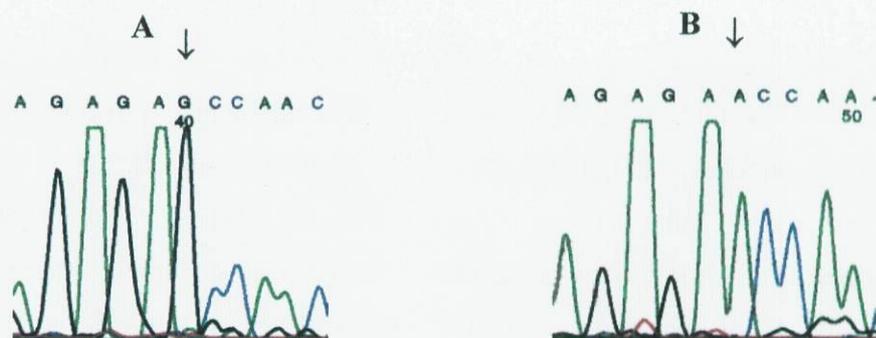


Figura 2-16 Representação parcial da sequência do tRNA<sup>Lys</sup> do D42 (A) e de um controlo normal (B).

No Quadro 2-9 estão referidos os fenótipos clínicos e os dados genéticos dos dois doentes em que a “mutação MERRF” foi detectada .

Quadro 2-9 Dados clínicos, bioquímicos e moleculares dos dois doentes com a mutação A8344G.

Doente	Fenótipo Clínico	Idade de início /sexo	História familiar	Estudo miopatológico	% mtDNA mutado		Actividade enzimática residual dos complexos da CRM
					músculo	/sangue	
D28	Miopatia	32 / M	Negativa	RRF	89	81	III (28%); IV(36%)
D91	MERRF	11 / F	Positiva	Acumulação de lípidos	96	64	IV (17%)

O D28 actualmente com 43 anos, apresenta uma miopatia proximal (queixas de fraqueza proximal dos quatro membros, com agravamento progressivo desde há cinco anos) com presença de algumas RRFs. Apresenta a particularidade de após quatro anos de evolução ainda não ter desenvolvido qualquer sintoma cerebral (Berkovic *et al*, 1989).

O D91 apresentou para além do atraso mental moderado, convulsões tónico-clónicas generalizadas desde os 11 anos e ataxia cerebelosa. Faleceu recentemente com 13 anos. O estudo histopatológico da biópsia muscular revelou a presença de alterações inespecíficas salientando-se a presença de grande quantidade de lípidos. É de realçar que, apesar de por definição, estes doentes evidenciarem RRFs na biópsia muscular, nesta doente elas não foram visualizadas nos vários cortes histológicos efectuados. Ocasionalmente, têm sido referidos casos semelhantes (Fukuhara, 1995; Campos *et al*, 1996). A manifestação da doença pode ocorrer desde a infância até idades mais avançadas embora seja mais frequente durante a segunda década de vida como o D91.

Nos dois doentes com a mutação A8344G ainda não foi possível estudar as respectivas famílias, embora a D28 tenha uma história familiar positiva: a morte em estado de mal convulsivo da mãe aos 46 anos, e de dois irmãos de 9 e 14 anos. O D91 não tem familiares da linha materna vivos e a filha era saudável. Nenhum era portador de lipomatose. Diferentes formas de apresentação têm sido detectadas mesmo dentro da mesma família, o que indica que este síndrome pode ter uma grande heterogeneidade clínica (Lombès *et al*, 1989). A mutação T8356G descrita, associada ao MERRF, não foi identificada nos doentes deste estudo.

#### Mutações pontuais T8993G/C

As mutações 8993 T→G/C localizadas na ATPase 6 podem originar um fenótipo clínico de síndrome de Leigh (SL). No decurso deste estudo foram diagnosticados três doentes com a mutação T8993G e dois com a substituição menos frequente T8993C. A mutação do nucleótido 8993 quer com a transição T → G quer T → C cria mais um local de restrição com a enzima *MspI* (Figura 2-17).

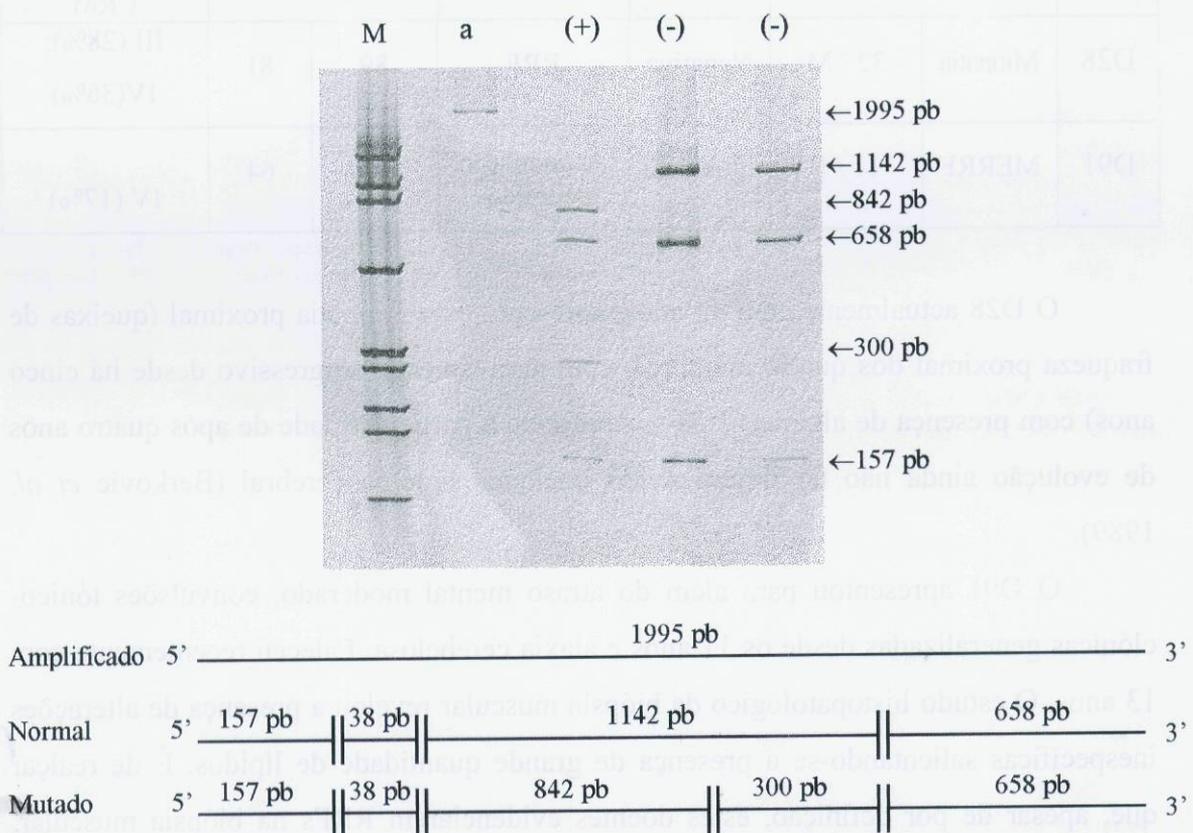


Figura 2-17 Detecção das mutações T8993G/C por PCR e digestão com a enzima *MspI*. (a) fragmento amplificado e não digerido; (-) controlo negativo; (+) controlo positivo; (M) marcador.

Estas mutações do gene ATPase 6 originam a substituição de um resíduo de leucina por um de arginina na T8993G (Holt *et al*, 1990) e por um de prolina na T8993C (de Vries *et al*, 1993; Santorelli *et al*, 1994).

Uma vez detectadas por ensaio de restrição, as mutações foram confirmadas por sequenciação (Figura 2-18).

No Quadro 2-10 estão referidos os cinco doentes detectados neste estudo portadores das mutações T8993G/C.

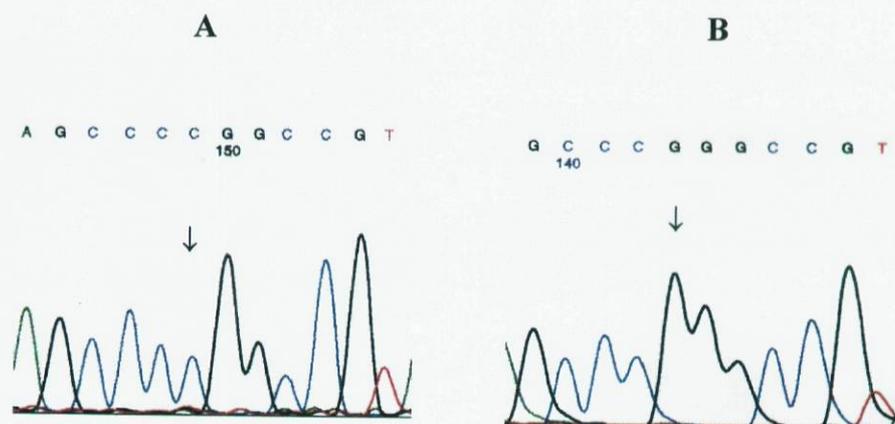


Figura 2-18 Representação parcial da sequenciação do gene da ATPase 6 evidenciando a mutação T8993C (A) e a T8993G (B).

Quadro 2-10 Dados clínicos, morfológicos, bioquímicos e moleculares dos cinco doentes com as mutações T8993G/C.

Doentes	Fenótipo clínico	Idade de início/sexo	Estudo miopatológico	Mutação e quantidade mtDNA mutado	Actividade enzimática residual dos complexos da CRM
D56 (família A)	SL	1 / M	Sem alterações	T8993G 95% (M)	Normal
D90 (família B)	SL	3 / F	Sem alterações	T8993G > 99% (M)	IV – 33%
D86 (família C)	SL	5 / F	Sem alterações	T8993G 95% (M)	Normal
D33	NARP	15 / M	N.D.	T8993C 99% (S)	N.D.
D87	NARP	15 / F	N.D.	T8993C 85% (S)	N.D.

Abreviaturas: F (feminino); M (masculino); SL, síndrome de Leigh; NARP, neuropatia, ataxia e retinite pigmentar ; N.D. (não determinado); M (músculo) e (S) sangue.

Estes casos com fenótipo clínico de NARP ou de MILS, associados a dados imagiológicos característicos, foram investigados sob o ponto de vista molecular apesar do estudo bioquímico não ter sido informativo, pois necessitaríamos de dispor de músculo fresco para determinar a actividade enzimática da ATPase. No entanto, Tatuch *et al*, 1995 demonstraram que a ATPase não está afectada nestes casos e mais tarde, Vasquez-Memije *et al*, em 1997 e 1998 corroboraram o mesmo nos fibroblastos e em *cíbridos* que continham cerca de 100% de mutação. Contudo, recentemente Hartzog *et al*, 1999 demonstraram uma redução da translocação de protões através da F1F0 da ATPase na *Escherichia coli*, utilizada como modelo bioquímico de SL com a mutação T8993C.

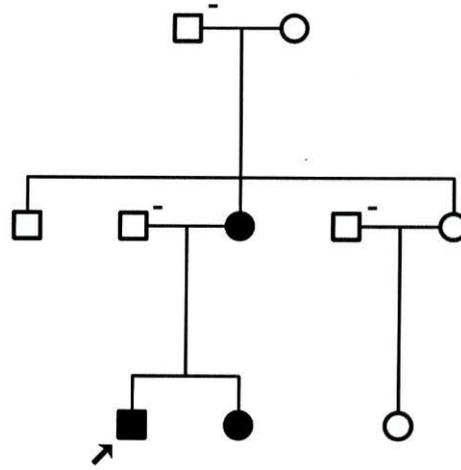
Nos dois doentes com a transição T→C, a pesquisa foi efectuada unicamente em sangue, com base no fenótipo clínico.

A mutação T8993G, quando presente em grande quantidade (>90%), provoca o SL e em menor percentagem origina o fenótipo de NARP normalmente com revelação na fase adulta (Tatuch *et al*, 1992). Os três casos com T8993G (D90; D56 e D86) apresentaram-se como SL. A mutação T8993C presente nos casos D33 e D87 é menos frequente, mas possui características clínicas semelhantes às da mutação T8993G. Contudo, a evolução parece ser mais lenta, com flutuações e a gravidade do fenótipo clínico não se correlaciona com a percentagem de mtDNA mutado (Makino *et al*, 2000). Este dado já tinha sido sugerido por outros autores (Rahman *et al*, 1996; Santorelli *et al*, 1996). A explicação para estas diferenças pode estar nos diferentes aminoácidos substituídos.

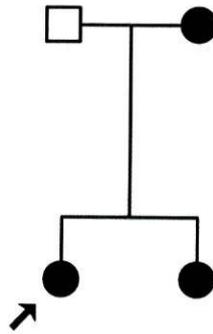
Foram estudados 11 indivíduos das três famílias dos doentes com a mutação T8993G o que permitiu a identificação de mais um caso sintomático, irmã do D90, (com uma quantidade de mtDNA mutado superior a 99%) e de quatro portadores assintomáticos (mães dos D56, D90, D86 e irmã do D56 com 21%, 76%, <5% e 49%, de mtDNA mutado, respectivamente). As árvores familiares estão representados na Figura 2-19. O estudo familiar dos probandos com a mutação T8993C encontra-se em curso.

As outras mutações T8851C e T9176C/G pesquisadas neste fenótipo revelaram-se negativas em todos os casos.

Família A



Família B



Família C

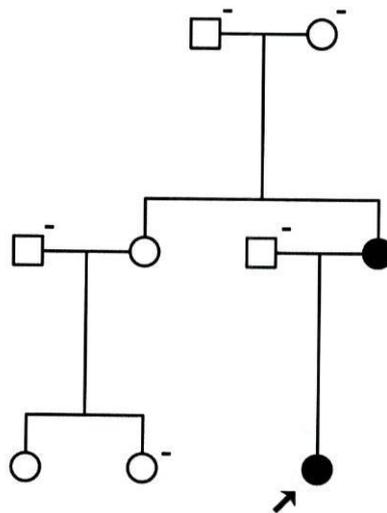


Figura 2-19 Árvores familiares dos doentes portadores da mutação T8993G. Os símbolos preenchidos indicam os indivíduos portadores da mutação; os símbolos não preenchidos os casos negativos; o sinal negativo (-) indica que os indivíduos não foram estudados para esta mutação. As setas indicam os probandos.

**Mutação pontual G11778A**

A mutação pontual G11778A (Figura 2-20), localizada no gene ND4, resulta na substituição de uma arginina por uma histidina num local altamente conservado. É a mutação mais frequente e mais grave associada à LHON e foi identificada em três doentes jovens do sexo masculino em homoplasmia (Quadro 2-11).

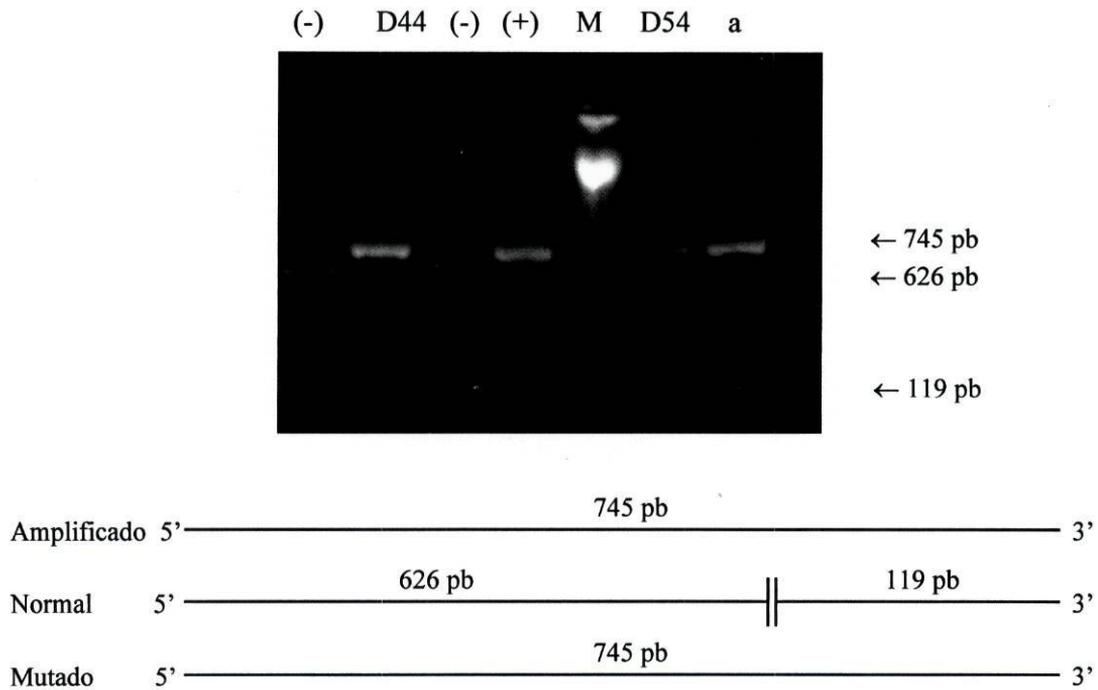


Figura 2-20 Detecção da mutação G11778G por PCR/RFLP num gel de agarose a 1% em TAE. (a) fragmento amplificado e não digerido; (-) controlo negativo; (M) marcador de peso molecular conhecido; (+) controlo positivo; e (D44 e D54) casos positivos.

Quadro 2-11 Dados dos três doentes em que a mutação pontual G11778G foi detectada

Doente	Fenótipo clínico	Idade de início (anos) /sexo	% mutado	
			músculo	sangue
D44	LHON	32 / M	-	100
D54	LHON	25 / M	-	100
D102	LHON	17 / M	-	100

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com a frequência desta mutação na LHON, assim como com a idade e o predomínio no sexo masculino. Os três

doentes eram portadores da mutação mais comum em homoplasmia e apresentavam o fenótipo característico de LHON. Duas famílias recusaram qualquer investigação, o que não permitiu determinar a expressão da mutação. A terceira família está a ser presentemente investigada.

Todos os doentes com atrofia óptica foram também testados para as mutações G3460A, T14484C, e G15257A sem positividade.

### **Outras mutações**

Neste estudo não foi identificado nenhum doente com as mutações T8356C ou T-3271C, embora fossem sistematicamente rastreadas juntamente com as mutações mais comuns associadas a determinados fenótipos.

Nos doentes com RRFs procedeu-se à sequenciação dos tRNAs. Uma vez que o tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> é o tRNA com mais mutações descritas, este foi sequenciado em 53 doentes, seguido do tRNA<sup>Lys</sup> em 37, do tRNA<sup>Ile/Met/Gln</sup> em 9, do tRNA<sup>Phe</sup> em 8 do tRNA<sup>Val</sup> em 6 e do tRNA<sup>Tre/Ala</sup> em 2. O estudo dos restantes tRNAs encontra-se em curso.

### **Polimorfismos**

Para além das mutações patogénicas anteriormente referidas, foram ainda identificadas 27 mutações que mereceram uma investigação no sentido de averiguar o seu carácter patogénico. Constatamos que 19 (Quadro 2-12) já tinham sido descritas por outros grupos como polimorfismos, não havendo qualquer referência às restantes oito (Quadro 2-13). Em todos os casos que se deram transições, as purinas (A ou G) substituíram purinas e as pirimidinas (C ou T) substituíram pirimidinas. Transversões, purinas substituindo pirimidinas ou vice-versa foram raras, como o caso da mutação A574T.

Apesar do mtDNA ser um genoma com elevado número de polimorfismos, uma mutação não significa necessariamente uma alteração funcional, embora, como a informação genética do mtDNA está muito compactada, uma mutação possa facilmente atingir um gene codificante e originar uma doença mitocondrial. De uma maneira geral as variantes não patogénicas ocorrem em homoplasmia, ou seja, cada indivíduo é constituído por uma população uniforme de moléculas de DNA. As mutações

patogénicas, por outro lado, apresentam-se maioritariamente em heteroplasmia, com os indivíduos a possuírem mais do que uma variante da molécula de mtDNA.

Quadro 2-12 Polimorfismos já descritos encontrados neste estudo.

Mutação	Localização no mtDNA	Referência
T489C	<i>D - loop</i>	Ozawa <i>et al</i> , 1991
Δ514CA	<i>D - loop</i>	Ozawa <i>et al</i> , 1991
G1719A	16S rRNA	Marzuki <i>et al</i> , 1991
T1738C	16S rRNA	Polyak <i>et al</i> , 1998
C3192T	16S rRNA	Shoffner <i>et al</i> , 1993
T3197C	16S rRNA	Sternberg <i>et al</i> , 1998
T3308C	ND1	Campos <i>et al</i> , 1997
T5655C	tRNA <sup>Ala</sup>	Polyak <i>et al</i> , 1999
G7521A	tRNA <sup>Asp</sup>	Moraes <i>et al</i> , 1993
G8251A	COX II	Tanaka <i>et Ozawa</i> , 1994
A8348G	tRNA <sup>Lys</sup>	Sternberg <i>et al</i> , 1998
C8393T	ATPase 8	Andreu <i>et al</i> , 1999
T8448C	tRNA <sup>Lys</sup>	Rieder <i>et al</i> , 1998
C8468T	ATPase 8	Moraes <i>et al</i> , 1993
Δ 9 bp	COXII/tRNA <sup>Lys</sup>	Passarino <i>et al</i> , 1993
A8512G	ATPase 8	Suomalainen <i>et al</i> , 1992
G8519A	ATPase 8	Shields Keith <i>et al</i> , 1999
A10398G	ND3	Ozawa <i>et al</i> , 1991
A14769C	Cit <i>b</i>	Andreu <i>et al</i> , 1999

As mutações patogénicas de baixa morbidade em que o aparecimento de sintomas é tardio, como é o caso da G11778A associado à LHON, comportam-se de forma semelhante a polimorfismos de baixa frequência, apresentando-se caracteristicamente em homoplasmia e estão geralmente associadas a um único haplótipo ancestral (Wallace, 1995).

Muitas mutações "neutras" fixam-se no genoma, contribuindo para a grande diversidade do mtDNA entre os grupos étnicos e dos próprios indivíduos como se provou com a mutação T3308C. Inicialmente publicada como mutação patogénica (Campos *et al*, 1997) foi equacionada por nós como polimorfismo (Vilarinho *et al*,

1999) e posteriormente confirmada como sendo um polimorfismo marcador do haplogrupo L1b.

Esta mutação foi inicialmente suposta patogénica, devido em parte à heteroplasmia que lhe estava associada, contudo, mais tarde foi comprovado, que se tratou de uma digestão incompleta pela enzima de restrição utilizada. Recentemente outro caso similar, o polimorfismo A5656G, foi objecto de publicação (Finnila *et al*, 1999).

No Quadro 2-13 estão referidas as mutações ainda não descritas. Neste grupo inclui-se a T10101C localizada no gene ND3, sobre a qual não se questionou a sua patogenicidade, uma vez que não induz uma substituição aminoacídica. No entanto, outras há em que a sua patogenicidade deve ser esclarecida.

Quadro 2-13 Novas mutações detectadas neste trabalho e ainda em estudo.

Mutação	Gene	Substituição aminoacídica
A574T	<i>D-loop</i>	-
C1677T	16S rRNA	-
G5773A	tRNA <sup>Cys</sup>	-
T9137C	ATPase 6	Ile → Leu
T10031C	tRNA <sup>Gly</sup>	-
T10101C	ND3	Leu → Leu
G12318A	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	-
C14751T	<i>Cit b</i>	Thr → Ile

Todas estas mutações foram detectadas em doentes cuja mutação patogénica ainda não foi identificada, à excepção da G12318A, encontrada no D78 e que apresentou deleções múltiplas no mtDNA.

Neste grupo, incluem-se mutações em genes estruturais e em RNAs.

A averiguação da patogenicidade destas mutações incluirá estudos familiares, definição de heteroplasmia e a pesquisa da sua existência numa amostra normal, haplotipicamente bem definida, uma vez que é essencial que a amostra controlo pertença à mesma população da amostra investigada. Nos casos em que esta pesquisa se revelar inconclusiva, a continuação do estudo passará pela realização de estudos de expressão.

### 3. Discussão global e perspectivas

#### 3.1 Actualidade e importância do trabalho

Contrariamente à genética mendeliana, cujas leis foram identificadas no século XIX, a genética mitocondrial é uma área científica muito jovem com a qual emergem novos conceitos como a heteroplasmia e a hereditariedade materna e um novo grupo de doenças causadas por alterações do mtDNA.

Desde 1988, têm sido publicados vários trabalhos sobre a análise mutacional dos défices da CRM e seu prognóstico. A acumulação de conhecimentos relativamente às doenças mitocondriais e em especial àquelas causadas pelas mutações no mtDNA, suscitou nos últimos anos um profundo interesse no controlo metabólico da OXPHOS (Villani *et al*, 1997). Embora ocorra uma multiplicidade de reacções bioquímicas na mitocôndria, o sistema OXPHOS é o mais importante em termos de produção de ATP e de relação com a doença humana.

Todos os trabalhos que possam contribuir para uma melhor informação e conhecimento dos défices da CRM são, então, de grande importância. A escassez de dados sobre esta temática no nosso País e na nossa população, e a necessidade premente de esclarecer em termos bioquímicos e genéticos numerosas situações, levou-nos ao implemento da metodologia necessária a um diagnóstico preciso destas patologias.

Uma vez que só num número limitado de casos é possível identificar as mutações causadoras das doenças mitocondriais, os estudos bioquímicos constituem um meio importante para a detecção dos défices da CRM.

Desde que a primeira doença causada por um defeito num gene do mtDNA foi identificada (Holt *et al*, 1988; Wallace *et al*, 1988), mais de 50 mutações pontuais patogénicas diferentes (DiMauro *et Schon*, 1998) e de uma centena de deleções (Wallace *et al*, 1993) foram referidas. Se considerarmos que muitas destas doenças têm associada uma hereditariedade materna (Shoffner *et al*, 1996), então os defeitos do mtDNA são no seu conjunto uma das principais causas das doenças hereditárias do metabolismo (Chinnery *et Turnbull*, 1998). Incluídas neste tipo de doenças, as alterações do metabolismo energético mitocondrial e, mais concretamente, os défices da

CRM têm uma incidência aproximada de 1/10.000 recém-nascidos, sendo portanto a maior causa de hiperlactacidemia primária (Bourgeron *et al*, 1995).

Com base exclusivamente nos dados clínicos, o diagnóstico destas situações é particularmente difícil devido ao largo espectro de sintomas associados a estas doenças (DiMauro *et al*, 1998), contribuindo para este facto fundamentalmente: a natureza ubiquitária das mitocôndrias, o duplo controlo genético da CRM e os aspectos peculiares da genética mitocondrial (DiMauro *et al*, 1996). De um número total de 435 indivíduos clinicamente suspeitos e investigados neste trabalho, só em 102 (23%) o diagnóstico foi confirmado através de uma abordagem multidisciplinar: miopatológica, enzimática e molecular.

### 3.2 Heterogeneidade clínica

#### Extrema variabilidade de apresentação clínica

Este estudo confirma o largo espectro de doenças associadas à disfunção da CRM referenciadas em várias revisões (Bindoff *et al*, 1990; Rowland *et al*, 1991; Munnich *et al*, 1992; DiMauro *et Moraes*, 1993; Jackson *et al*, 1995).

Nas citopatias mitocondriais, todos os tecidos e órgãos podem ser atingidos, mas os tecidos com elevada dependência do metabolismo energético, como os músculos esquelético e cardíaco e o SNC, são os mais vulneráveis. A presença de uma porção, ainda que pequena, de mtDNA mutado pode afectar a capacidade respiratória destes tecidos, enquanto que grandes quantidades podem ter um efeito devastador na sua função. Assim se compreende que as doenças mitocondriais sejam predominantemente encefalo(mio)patias (DiMauro *et al*, 1993).

Com este estudo pudemos efectivamente verificar que a maioria dos doentes diagnosticados teve uma expressão exclusivamente neuromuscular. No entanto, um número significativo de doentes apresentou um largo espectro de manifestações clínicas, resultantes de defeitos genéticos da OXPHOS noutros tecidos e órgãos como fígado, coração, rim, órgãos sensoriais e pele.

Embora não muito frequente, a falência hepática progressiva pode também ser uma das múltiplas apresentações clínicas dos défices da CRM. Neste estudo, foram identificados quatro doentes com falência hepática (D59; D72; D76; D98) que tiveram

evolução fatal num curto espaço de tempo, de modo semelhante a outros casos descritos na literatura (Mazzela *et al*, 1997).

Finalmente, as doenças psiquiátricas podem constituir uma forma de apresentação de doenças mitocondriais (Suomalainen *et al*, 1992), sendo a depressão a forma mais importante associada a mutações "primárias" do mtDNA, como se demonstrou nos familiares maternos dos casos index com a mutação MELAS (Vilarinho *et al*, 1999<sup>b</sup>). Provavelmente o papel das mutações do mtDNA tem sido subestimado em psiquiatria (McMahon *et al*, 1995), se atendermos ao número de doentes em que neste estudo foram identificados problemas psiquiátricos. Num número reduzido de doentes o autismo, caracterizado por um atraso na aquisição de linguagem, percepção e socialização foi um dado referenciado e englobado na encefalopatia.

A investigação destes doentes é um desafio, dada a variabilidade do fenótipo clínico. As doenças mitocondriais fazem parte do diagnóstico diferencial de muitos erros inatos do metabolismo, assim como de diversas doenças adquiridas do adulto.

Certas associações de sinais e sintomas podem alertar o clínico para este tipo de diagnóstico: pequena estatura, surdez neuro-sensorial, PEO, neuropatia axonal, diabetes mellitus, cardiomiopatia hipertrófica e acidose tubular renal (DiMauro *et Schon*, 1998), tal como se verificou nos doentes estudados. No SL, a causa mitocondrial deve sempre ser equacionada, como se comprovou nos cinco casos diagnosticados (D33; D56; D86; D87 e D90).

É importante salientar, que as formas de apresentação mais frequentes (o quadro miopático, a encefalopatia e a PEO) foram também, com excepção da PEO, muito comuns nos suspeitos não confirmados, uma vez que a PEO pode ter diferentes etiologias (Rowland *et al*, 1997).

Não há por conseguinte, um quadro clínico específico de citopatia mitocondrial. É a associação de sintomas e sinais neurológicos, não explicáveis em termos de topografia de lesões ou de atingimento preferencial de sistemas específicos, que pode fazer evocar o diagnóstico.

### **Influência da idade nas manifestações clínicas**

A população incluída neste estudo cobre um amplo leque etário, o que permitiu comprovar a variação de expressão da doença segundo a idade: quadros encefalopáticos (atraso mental e epilepsia) predominaram nas crianças e adolescentes, enquanto que a PEO

foi uma apresentação mais frequente no adulto, aumentando a frequência do seu aparecimento de forma progressiva com a idade.

O início da sintomatologia pode ocorrer ainda *in utero* como sucedeu com os seis doentes diagnosticados (D6; D10; D17; D18; D69; D72) que apresentavam dismorfias e atraso de crescimento intra-uterino, ou mais tardiamente como nos casos com KSS ou nos quadros puramente miopáticos.

No período neonatal, devido às grandes necessidades energéticas do recém-nascido, uma doença da CRM provoca frequentemente um quadro de hipotonia, letargia, dificuldades respiratórias e de alimentação, atraso de crescimento, convulsões e vômitos (Jackson *et al*, 1995; Sue *et al*, 1999), como sucedeu com cinco doentes deste estudo (D15; D48; D51; D56; D70). Estes sintomas, associados a hiperlactacidemias moderadas a graves, podem inicialmente ser confundidos com os provocados por anóxia, sepsis ou outras doenças metabólicas.

Durante o primeiro ano de vida, existe geralmente um atingimento plurivisceral com sintomatologia de gravidade variável, podendo ser, por vezes, rapidamente mortal. Na infância e adolescência, os quadros clínicos neurológicos têm grande importância paralelamente com a variada sintomatologia não neuromuscular. Nesta série, os doentes que surgiram com quadros neuromusculares e cardíacos nos períodos neonatal e lactente tiveram uma evolução extremamente grave, tendo oito vindo a falecer. Na avaliação cardiológica, encontramos manifestações de cardiomiopatia hipertrófica ou dilatada em nove crianças que iniciaram precocemente as suas manifestações clínicas, como os casos descritos por Anan *et al*, 1995 e Marin-Garcia *et al*, 1996.

Dos doentes diagnosticados, 22 já faleceram. Estes tinham idades compreendidas entre um mês e os 36 anos e apresentavam um atingimento multissistémico ou síndromes clássicas de citopatia mitocondrial. Poderemos pois inferir que, quanto mais precoce for a apresentação clínica, mais grave será o prognóstico. É contudo de realçar, que algumas das crianças que faleceram tinham uma actividade enzimática da CRM residual mais elevada do que as outras que sobreviveram. Algumas destas crianças encontram-se com uma evolução aparentemente favorável. Estes aspectos testemunham a dificuldade existente em estabelecer correlações entre o quadro clínico e o defeito enzimático já comprovado por outros grupos (DiMauro *et al*, 1993; Dougherty *et al*, 1994; Adams *et al*, 1996).

O ligeiro predomínio deste tipo de patologia observado no sexo masculino, nesta casuística, não é significativo.

### Raridade dos síndromes clássicos

Em alguns casos, os sintomas podem progredir e envolver sucessivamente novos órgãos e sistemas, sendo susceptíveis de ser agrupados em síndromes clínicas específicas. Alguns destes síndromes são de tal forma característicos, que o seu diagnóstico não oferece grande dificuldade. Trata-se contudo de situações relativamente raras, tal como se pode constatar com este estudo, no qual somente 24 dos 102 (24%) doentes estudados eram portadores de síndromes clássicas.

Nas doenças da CRM é comum a heterogeneidade clínica entre os diferentes doentes e inclusive entre os membros afectados da mesma família. É, por exemplo, extremamente raro observar mais do que um doente com fenótipo MELAS típico numa família; os restantes familiares são normalmente oligossintomáticos ou assintomáticos, como se pode confirmar com os nossos estudos familiares. Só em três casos dos seis com fenótipo de MELAS foi identificada a mutação mais comum A3243G associada a este síndrome.

Outro exemplo de heterogeneidade clínica foi observado no caso da família do D90, uma criança de três anos, que após um síndrome febril desenvolveu um quadro de fraqueza muscular progressiva ficando em estado comatoso e apneico. A RMN cerebral efectuada revelou alterações compatíveis com um síndrome de Leigh. A irmã de oito anos de idade, na altura sem diagnóstico, apresentava atraso mental e paraparesia espástica. Ambos os doentes eram portadores da mutação T8993G em quantidade semelhante, com apresentações bastante diferentes e graves.

Os dois doentes portadores da mutação mais comum associada ao MERRF (A8344G) identificados neste estudo, apresentaram um quadro clínico de diferente gravidade e com distintas idades de início de sintomas. Enquanto que o D28, actualmente com 43 anos de idade, apresenta uma fraqueza muscular proximal que teve início há cerca de cinco anos e que tem sido de progressão lenta, no D91 os primeiros sintomas revelaram-se na segunda infância, vindo a falecer com 13 anos de idade.

O KSS foi dos síndromes mais frequentes na nossa casuística, embora com diferentes apresentações clínicas. A idade de diagnóstico oscilou entre os 12 e os 24 anos e todos tinham deleções simples de grande tamanho no mtDNA. No D40 o diagnóstico molecular foi efectuada em DNA leucocitário, devido à inexistência de material de biópsia muscular. Dada a natureza multissistémica do KSS, outros órgãos podem estar envolvidos e diferentes percentagens de mtDNA mutado podem estar

presentes, ao contrário do que sucede com as PEO em que as deleções estão normalmente confinadas ao músculo esquelético (Shanske *et al*, 1990).

### **História familiar**

Qualquer tipo de hereditariedade pode estar associado às citopatias mitocondriais, mas a hereditariedade materna é particular do genoma mitocondrial.

Quando se considera a possibilidade de uma doença ser devida a alterações do mtDNA, a história familiar deve ser meticolosamente recolhida, prestando especial atenção aos "sinais menores" observados nos familiares da linha materna.

Em oito doentes houve suspeita duma hereditariedade materna, sugerindo a pesquisa de mutações pontuais no mtDNA. Na maioria dos casos, não foi possível avaliar minuciosamente a história familiar. Certas características da genética mitocondrial, nomeadamente a heteroplasmia e o limiar de expressão, podem mascarar a transmissão materna, devido à heterogeneidade fenotípica intrafamiliar bastante marcada. É, no entanto, de referir que pequenos "sinais" podem ser considerados suspeitos nos familiares maternos tais como: pequena estatura, enxaqueca, surdez ou diabetes, entre outros (DiMauro *et Schon*, 1998).

Na história familiar de dois probandos, D74 e D41, registaram-se abortos de repetição e morte súbita inexplicável do lactente (SIDS), respectivamente.

Observou-se consanguinidade em 18 doentes, o que pode sugerir um padrão de transmissão hereditária autossómico recessivo. Neste grupo estão incluídos os dois doentes (D15 e D97) que apresentaram os défices do complexo II, e os dois doentes (D34 e D37) com défice do complexo III (numa família de três irmãos com o mesmo grau de defeito enzimático).

### **Vários fenótipos para o mesmo genótipo**

Nem sempre as doenças mitocondriais podem ser identificadas pelas mutações do mtDNA. Trata-se de um problema bidirecional, uma vez que nem todos os doentes com o mesmo síndrome clínico apresentam a mesma mutação do mtDNA e a mesma mutação pode estar associada a síndromes clínicas totalmente diferentes.

A mutação MELAS A3243G ilustra bem a larga variedade de fenótipos clínicos distintos que podem estar associados ao mesmo defeito genético. Alguns doentes portadores desta mutação desenvolvem uma encefalopatia grave, como o D5, ou

apresentam uma cardiomiopatia, como o D29, com uma evolução rápida e fatal. Outros apresentam uma PEO associada a uma diabetes numa idade mais avançada, caso do D38, ou uma diabetes mellitus acompanhada de pequena estatura e mais tarde, encefalopatia, como no D100, tendo conseqüentemente uma evolução mais arrastada, de forma idêntica à observada por outros autores (Remes *et al*, 1993). Esta mutação foi ainda identificada no D73 com uma apresentação *Leigh-like* (Vilarinho *et al*, 1997<sup>c</sup>), fenótipo extremamente raro para esta mutação, só encontrada anteriormente por Koga *et al*, 1995.

MELAS não é, por conseguinte, a única expressão da mutação A3243G do mtDNA. Alguns doentes com PEO (Moraes *et al*, 1993), diabetes mellitus e surdez de transmissão materna (van den Ouweland *et al*, 1992) ou com características habitualmente associadas a MERRF, são também portadores desta mutação pontual. A PEO de hereditariedade materna pode ser uma das suas manifestações, como podemos comprovar no D38, que apresentava a mutação A3243G e numa percentagem comparável aos casos típicos de MELAS. Para além desta mutação, outras mutações pontuais do mtDNA podem ser responsáveis pelo fenótipo de PEO, embora esta seja a mais frequente. Vários estudos têm sido levados a cabo numa tentativa de demonstrar que a diabetes mellitus é a terceira apresentação clínica mais frequente da mutação A3243G (Kadowaki *et al*, 1994; Matsura *et al*, 1999).

Esta diferença entre os fenótipos pode ser explicada em parte pela quantidade de mtDNA mutado presente, embora a distribuição subcelular do mtDNA (intramitocondrial) também pareça ser importante para a patogénese (Moraes *et al*, 1990; Hammans *et al*, 1992).

O fenótipo de NARP pode evoluir para SL variando unicamente a percentagem de mtDNA mutado; o mesmo pode acontecer com o síndrome de Pearson, que é susceptível de evoluir para KSS (Larsson *et al*, 1990) ou eventualmente para SL (Santorelli *et al*, 1996).

Nos défices da CRM com alterações do mtDNA é particularmente difícil obter uma correlação genótipo/fenótipo, porque a percentagem de mtDNA mutado pode oscilar entre zero e aproximadamente 100%. Dada esta grande variabilidade percentual, a constituição genotípica nunca é a mesma, embora esteja envolvida a mesma mutação.

Foi sugerido que os doentes com PEO apresentam acumulações focais de um número relativamente pequeno de mitocôndrias que contêm altas percentagens da mutação, enquanto que os doentes com MELAS "puro" revelam uma distribuição mais uniforme de altas percentagens de mtDNA mutado (Petruzella *et al*, 1994; Chinnery *et al*, 1997). Estas observações sugerem que a distribuição do mtDNA mutado é particularmente importante na determinação do fenótipo da doença, embora nos fenótipos neurológicos esta correlação possa não ser tão linear (Sue *et al*, 1999).

### Vários genótipos para o mesmo fenótipo

Neste estudo houve dois fenótipos, SL (Quadro 3-1) e a PEO, que são bons exemplos da heterogeneidade genotípica associada ao mesmo fenótipo e que cursam com diferentes tipos de hereditariedade.

### Síndrome de Leigh

O SL é uma doença hereditária neurodegenerativa, provocada por diferentes alterações do metabolismo energético. É uma das doenças mais comuns da CRM no lactente e na criança e trata-se de uma doença com grande heterogeneidade genética (DiMauro *et De Vivo*, 1996).

As mutações pontuais T8993G/C do mtDNA, que afectam a ATPase 6, de transmissão materna são uma causa relativamente comum de SL/NARP (Santorelli *et al*, 1993; 1996) e foram encontradas em cinco casos neste estudo. Os três doentes com a mutação T8993G tiveram uma apresentação clínica muito mais precoce e mais grave que os T8993C. A explicação para estas diferenças pode residir no tipo de aminoácidos substituídos (Leu/Arg) e (Leu/Pro) respectivamente (Hartzog *et al*, 1999). Para além destas mutações conhecidas, foi encontrada associada a este fenótipo a "deleção comum" numa criança de oito anos de idade que teve uma evolução grave e fatal aos 11 anos. Esta doença pode também ser causada por outras mutações mitocondriais no mesmo gene, nomeadamente a T9176C e a T8851.

O SL pode estar associado a deficiência de pelo menos três enzimas mitocondriais (Willems *et al*, em 1977): citocromo *c* oxidase (COX) e NADH-ubiquinona reductase (complexo I) de transmissão autossómica recessiva e a piruvato desidrogenase (PDH, E<sub>1α</sub>) codificada por um gene localizado no cromossoma X (Xp22.1), (Santorelli *et al*, 1993).

Segundo alguns autores (Zeviani *et al*, 1996) o défice da COX é o défice bioquímico mais frequentemente associado ao SL, embora este facto não tenha sido comprovado neste estudo. O defeito genético responsável ainda não foi identificado em nenhum doente, embora os genes nucleares para a COX tenham sido já caracterizados (Grossman *et al*, 1997).

Diversos estudos (Adams *et al*, 1997 e Parfait *et al*, 1997) foram direccionados no sentido de avaliar o papel do mtDNA no défice da COX através da sequenciação dos genes da COX codificados por este genoma, não tendo sido detectadas alterações nesses genes estruturais. Há, no entanto, a referir, que Keightley *et al*, 1996 encontrou num doente com mioglobinúria e défice da COX, uma microdeleção de 15pb no gene COXIII. Recentemente, Jaksch e colaboradores em 1998 estudaram os genes nucleares que codificam a COX, em doentes com défice da COX, mas nenhuma mutação foi identificada.

Em 1995, Bourgeron *et al*, encontraram em doentes com SL e défice do complexo II a mutação nuclear C1684T. Nos nossos dois casos de défice do complexo II, D15 e D97, a pesquisa desta mutação foi negativa.

Em 1998, Tiranti e colaboradores encontraram num doente com SL mutações no gene codificante para a subunidade SURF-1, que codifica a proteína mitocondrial necessária ao *assembling* das subunidades da COX.

Os doentes incluídos neste estudo que ainda não estão caracterizados a nível molecular e que têm uma apresentação clínica compatível com SL estão a ser testados para eventuais mutações no SURF-1.

## **PEO**

Os músculos extraoculares possuem propriedades estruturais e funcionais que os distinguem dos músculos esquelético e cardíaco. Têm um elevado conteúdo de genomas mitocondriais, associados a uma elevada actividade enzimática oxidativa, o que pode explicar a sua alta resistência à fadiga e um envolvimento preferencial nas doenças mitocondriais (Porter *et al*, 1996).

Neste estudo, a PEO foi observada associada aos seguintes genótipos: mutação A3243G, deleções simples e deleções múltiplas.

A principal causa de PEO associada a RRFs (Wallace, 1992) é efectivamente, como o nosso estudo mais uma vez demonstrou, a presença de deleções simples esporádicas do mtDNA.

Se a PEO se encontra associada a mutações pontuais nos nucleótidos 3243, 5692, 5703, 5877 ou 8363, o seu modo de transmissão é por via materna.

Pode contudo, ter ainda uma hereditariedade autossómica recessiva se a PEO se encontra acompanhada de uma encefalopatia, cardiopatia ou de MNGIE. Tanto nestes casos como na PEO de apresentação tardia autossómica dominante, as alterações genéticas presentes são deleções múltiplas.

Finalmente, a depleção pode também ser um genótipo de transmissão autossómica recessiva ligado a este fenótipo.

### 3.3 Heterogeneidade miopatológica

No diagnóstico das doenças mitocondriais a biópsia muscular tem um papel fundamental na análise genética. Todas as biópsias realizadas neste estudo foram cirúrgicas com anestesia local, como na maior parte dos estudos publicados. Este método fornece uma quantidade de material muito maior e de muito melhor qualidade do que as biópsias obtidas por agulha.

As alterações mais frequentemente encontradas na biópsia muscular foram a variabilidade do tamanho das fibras, as inclusões lipídicas e um aumento das fibras tipo I, que são na generalidade alterações inespecíficas.

Uma proliferação mitocondrial anormal constitui um marcador de disfunção mitocondrial que pode ser revelado pela presença de RRFs, como sucedeu em 56% dos 96 doentes que efectuaram biópsia de músculo ou por uma forte actividade da SDH como se verificou em 11% desses mesmos doentes. Esta alta incidência quando comparada com outras casuísticas (Munnich *et al*, 1996), deve-se ao número significativo de doentes pré-seleccionados com base neste parâmetro e ao facto dos doentes estudados abrangerem todos os grupos etários.

Estas alterações foram sempre encaradas com prudência, uma vez que o mesmo aspecto em quantidade reduzida pode corresponder a reorganizações da estrutura das fibras, secundárias a outras patologias de etiologia bem definida (DiMauro *et al*, 1992).

Quanto mais precocemente aparecerem as RRFs mais reservado será o prognóstico, dado que estas fibras são de instalação lenta e progressiva. Se numa

criança forem detectadas RRFs é o reflexo de alterações mitocondriais muito graves, ressaltando-se, o caso do SL que nunca apresenta RRFs na análise histoquímica. Não foi possível, em 16 casos pediátricos, associar um resultado miopatológico anormal a um défice enzimático dos complexos da CRM.

O exame ultraestrutural, embora actualmente tenha um interesse limitado para efeito de diagnóstico, foi contudo realizado em 32 biópsias musculares, revelando anomalias mitocondriais em 14 doentes.

### 3.4 Heterogeneidade bioquímica

O estudo bioquímico é uma das abordagens de primeira linha na avaliação de qualquer indivíduo com suspeita de doença mitocondrial. Uma disfunção da CRM devida à acumulação dos equivalentes reduzidos (NADH e FADH), traduzir-se-á numa diminuição da síntese de ATP e numa modificação profunda dos equilíbrios de oxidação-redução citoplasmático e mitocondrial, levando a numerosas perturbações metabólicas na célula. Conforme as necessidades energéticas do tecido, um défice da OXPHOS pode ter consequências variáveis.

#### Variações no lactato, aminoácidos e ácidos orgânicos

Embora durante muitos anos a acidose láctica tenha sido associada aos défices da CRM, não está invariavelmente presente nestas situações (Petty *et al*, 1986). A determinação de lactato é importante nas crianças, mas de interesse reduzido nos adultos, em particular nas PEO, mesmo quando existem outros sintomas associados.

Ao analisarmos os resultados dos 43 doentes em que foi investigado o lactato plasmático constatámos hiperlactacidemia em 38 (88%). Contudo, em pelo menos 10 destes doentes, o lactato tinha sido normal em determinações anteriores. Foram excluídas as hiperlactacidemias secundárias e foi dada especial atenção à colheita de sangue venoso para evitar estase venosa. Na realidade, a hiperlactacidemia pode ser intermitente, sendo por vezes necessárias determinações seriadas em tempos diferentes da evolução da doença para documentar a sua elevação (Munnich *et al*, 1991). Em alguns casos, nomeadamente aqueles em que a expressão clínica é fundamentalmente do SNC, o lactato plasmático pode ser normal, mas elevado no LCR (Saudubray *et al*, 1992), como aconteceu nos nossos doentes com NARP ou MILS. Tivemos ainda em

consideração que o nível de lactato no LCR se mantém elevado durante 48 horas após convulsões generalizadas (Calabrese *et al*, 1991) e que persiste até 10 dias após uma hemorragia subaracnóideia (Sambrook *et al*, 1973).

Deste estudo, podemos inferir que a concentração de lactato no sangue ou no LCR é mais informativa que a relação lactato/piruvato e que este parâmetro bioquímico aparenta ser um bom método de selecção para estas patologias.

Recorreu-se à prova de sobrecarga de glicose, que foi, na maioria dos casos preferencial em relação à prova de esforço físico, apesar de ambas serem não invasivas e muito informativas, devido, ao facto de não necessitar da participação activa do doente e ser aplicável a lactentes e a crianças da primeira infância.

A quantificação dos aminoácidos e dos ácidos orgânicos pode também fornecer informação importante, embora resultados normais não excluam o diagnóstico de doença mitocondrial. Na maioria dos doentes com hiperlactacidemia houve um aumento simultâneo da alanina no perfil cromatográfico dos aminoácidos plasmáticos. O estudo dos ácidos orgânicos urinários de 12 doentes revelou a presença de lactato e de metabolitos intermediários do ciclo de Krebs nomeadamente fumarato, malato e succinato.

Uma observação importante relaciona-se com o facto de dois dos doentes com a mutação T8993G apresentarem ao diagnóstico uma hipocitrulinemia grave no perfil cromatográfico dos aminoácidos, corroborando a recente publicação de Rabier *et al*, 1998, em que é equacionada esta mutação como uma nova situação em que a hipocitrulinemia se pode verificar. Normalmente uma hipocitrulinemia grave (<10  $\mu\text{mol/L}$ ) é uma das características bioquímicas importantes para o diagnóstico de algumas doenças metabólicas, nomeadamente das doenças mitocondriais do ciclo da ureia e do défice em pirrolina-5-carboxilato sintetase (Rabier *et al*, 1995), tendo sido também associada com o síndrome de Pearson (Ribes *et al*, 1993). Segundo Rabier *et al*, 1998 a hipocitrulinemia está presente em 90% dos NARP e entre 0-20% para os outros défices da cadeia respiratória.

Uma explicação provável para este facto é que, a inserção de uma arginina na sequência hidrofóbica da ATPase 6 interfere com o canal  $\text{H}^+$  formado pelas

subunidades 6 e 8 da ATPase, provocando uma deficiente produção de ATP (Tatuch *et al*, 1991) necessária à síntese da citrulina.

### **Actividade enzimática**

Nas citopatias mitocondriais a creatina fosfocínase (CK) está dentro dos valores de referência, mas apresenta valores muito elevados quando há uma depleção do mtDNA, o que leva à confusão com algumas doenças neuromusculares.

Um aumento da citrato sintetase está muitas vezes associada a défices musculares da CRM (DiMauro *et al*, 1983) e é devida a uma proliferação reaccional das mitocôndrias (Zeviani *et al*, 1991). Todas as actividades enzimáticas dos complexos estudados da CRM foram referidas à da citrato sintetase. Esta enzima controla parte integrante do ciclo de Krebs e normalmente não está deficitária, pois o seu défice seria incompatível com a vida, dada a sua importância crucial no metabolismo intermediário (De Vivo *et al*, 1996).

Apesar das enzimas da CRM poderem ser avaliadas em múltiplos tecidos, cada laboratório tem as suas preferências e maior experiência em relação a determinado tipo de células. Concretamente neste estudo, o músculo é a amostra investigada preferencialmente, devido ao seu alto metabolismo energético e ao facto de se encontrar quase invariavelmente afectado nas doenças mitocondriais multissistémicas. A vantagem da utilização de músculo fresco é permitir o isolamento de mitocôndrias intactas funcionantes que podem ser utilizadas nos estudos polarográficos (Munnich *et al*, 1996). Segundo alguns autores (DiMauro *et al*, 1999), estas avaliações não são essenciais para o diagnóstico e só raramente são efectuadas. As amostras de músculo congelado têm várias vantagens nomeadamente na conservação e transporte, especialmente no caso dos doentes residirem a grandes distâncias do laboratório de referência destes estudos.

Uma actividade enzimática dos diferentes complexos varia conforme o tecido, sendo mais elevada no miocárdio. Contudo, a organização da CRM é semelhante em todos os tecidos e as relações entre as actividades dos vários complexos (razões de actividade) mantêm-se constantes independentemente dos tecidos estudados (Chrétien *et al*, 1994).

Uma actividade normal da CRM não permite excluir uma citopatia mitocondrial mesmo que o tecido testado seja aquele que exprime a doença. É possível estarmos em

presença duma mutação que afecta as propriedades cinéticas de uma enzima, de uma heterogeneidade tecidual ou de um mosaicismo celular (heteroplasmia).

Os défices encontrados podem atingir de um modo individual ou em simultâneo diferentes complexos da CRM, não tendo o fenótipo clínico qualquer relação com o défice envolvido. No entanto, a análise enzimática efectuada nos doentes é importante para definir o fenótipo bioquímico e permitir orientar o estudo molecular. Assim, um défice múltiplo parcial dos complexos da CRM (codificados pelo mtDNA) normalmente significa um defeito da síntese das proteínas mitocondriais que estão muitas vezes associadas a mutações nos tRNAs codificados pelo mtDNA.

À semelhança de outros estudos, o presente trabalho revelou elevada prevalência do défice do complexo IV, quer isolado quer combinado, tendo sido detectado em 66 doentes com diferentes apresentações clínicas, fundamentalmente miopatias, mas também cardiomiopatias (Sengers *et al*, 1984) e hepatopatia isolada (Parrot-Roulard *et al*, 1991) ou combinada com encefalopatia (Merante *et al*, 1993). Esta alta percentagem de anomalias do complexo IV deriva provavelmente da crucial importância funcional deste complexo, de que resulta uma maior probabilidade dos doentes com este défice terem expressão sintomática.

Outros estudos (Robinson *et al*, 1998; Loeffen *et al*, 2000) referem o défice do complexo I como um dos mais frequente dos défices da CRM.

Os doentes com défices combinados revelaram tendência para uma apresentação mais grave do que os doentes com défice isolado do complexo I.

Neste trabalho, os défices isolados do complexo III foram identificados exclusivamente em doentes adultos, corroborando os dados de outros estudos (Reichmann *et al*, 1986; Slipetz *et al*, 1991; Andreu *et al*, 1998). No entanto, recentemente foi publicado um estudo em crianças com doenças neurológicas não específicas que revelou uma alta incidência do défice do complexo III (Marin-Garcia *et al*, 1999).

Do ponto de vista laboratorial, comprovaram-se também variações lógicas com a idade do doente, já referidas anteriormente, mas que gostaríamos de salientar; apesar dos défices mais graves da CRM serem mais frequentes nos jovens (porque acarretam uma maior gravidade clínica), as RRFs são mais frequentemente encontradas à medida que a idade dos doentes avança (porque são uma consequência da disfunção respiratória). Por conseguinte, a positividade do diagnóstico miopatológico e bioquímico varia inversamente com a idade.

É interessante referir que no presente estudo foram identificados dois doentes com défice isolado do complexo II, apesar de na literatura só estejam publicados cerca de uma dezena de casos (Bourgeron *et al*, 1995; Rivner *et al*, 1989; Rustin *et al*, 1993; Reichman *et al* Angelini, 1994; Birch-Machin *et al*, 1995) Trata-se de doentes que apresentam um quadro clínico de miopatia ou encefalopatia semelhante àquele por nós encontrado.

### 3.5 Heterogeneidade molecular

Os défices da CRM podem ser resultantes de alterações quer do mtDNA quer do nDNA, mas presentemente o diagnóstico estabelece-se fundamentalmente por análise do mtDNA.

A caracterização molecular dos doentes suspeitos de défice da CRM é um dos pilares em que assenta este tipo de diagnóstico. A presença de deleções do mtDNA valida muitas vezes os critérios clínicos. As deleções podem resultar de uma alteração do mtDNA secundariamente à formação de radicais de O<sub>2</sub> altamente reactivos na CRM. Esta hipótese é sustentada pelo facto do mtDNA mutado ser mais abundante nos tecidos mais dependentes do metabolismo oxidativo (Suomalainen *et al*, 1992).

As particularidades e os problemas dos testes do mtDNA dependem fortemente das características próprias desta molécula, tais como: a multiplicidade de cópias, vulnerabilidade à mutação e a transmissão materna. É de ressaltar que só a presença de mtDNA mutado num indivíduo não significa que este seja doente, como podemos comprovar com os estudos familiares realizados.

A nível celular, o principal factor responsável pela expressão do defeito genético é a percentagem de mtDNA mutado; a grande variação desta quantidade pode ser responsável pelos múltiplos fenótipos associados à mesma mutação patogénica.

Nos défices da CRM, o mtDNA está presente em heteroplasmia, embora, certas alterações presentes em homoplasmia possam também ser patogénicas, como a mutação no nt-11778. Estudos *in vitro* demonstraram que altos níveis de mtDNA mutado (em geral superiores a 85%) são necessários para que a célula expresse uma deficiência da CRM (Attardi *et al*, 1995). Contudo, o limiar de expressão é relativo, porque é determinado não só pelas necessidades metabólicas do tecido em questão, mas também em qualquer momento por necessidades acrescidas por diversos factores.

A casuística deste estudo é constituída por uma população pediátrica e por uma população adulta, sendo por conseguinte uma amostra representativa dos défices da CRM na população em geral (Anexo III). No conjunto, foram detectadas 50 mutações no mtDNA (Anexo VI). Na Figura 3-1 estão representadas na molécula do mtDNA, as mutações pontuais e as deleções simples identificadas neste estudo. É de salientar que a maioria destas alterações moleculares (68%) foi detectada na população adulta. Assim, podemos inferir que a taxa de positividade de mutações nas crianças é baixa (32%), contribuindo só num pequeno número de casos para o diagnóstico.

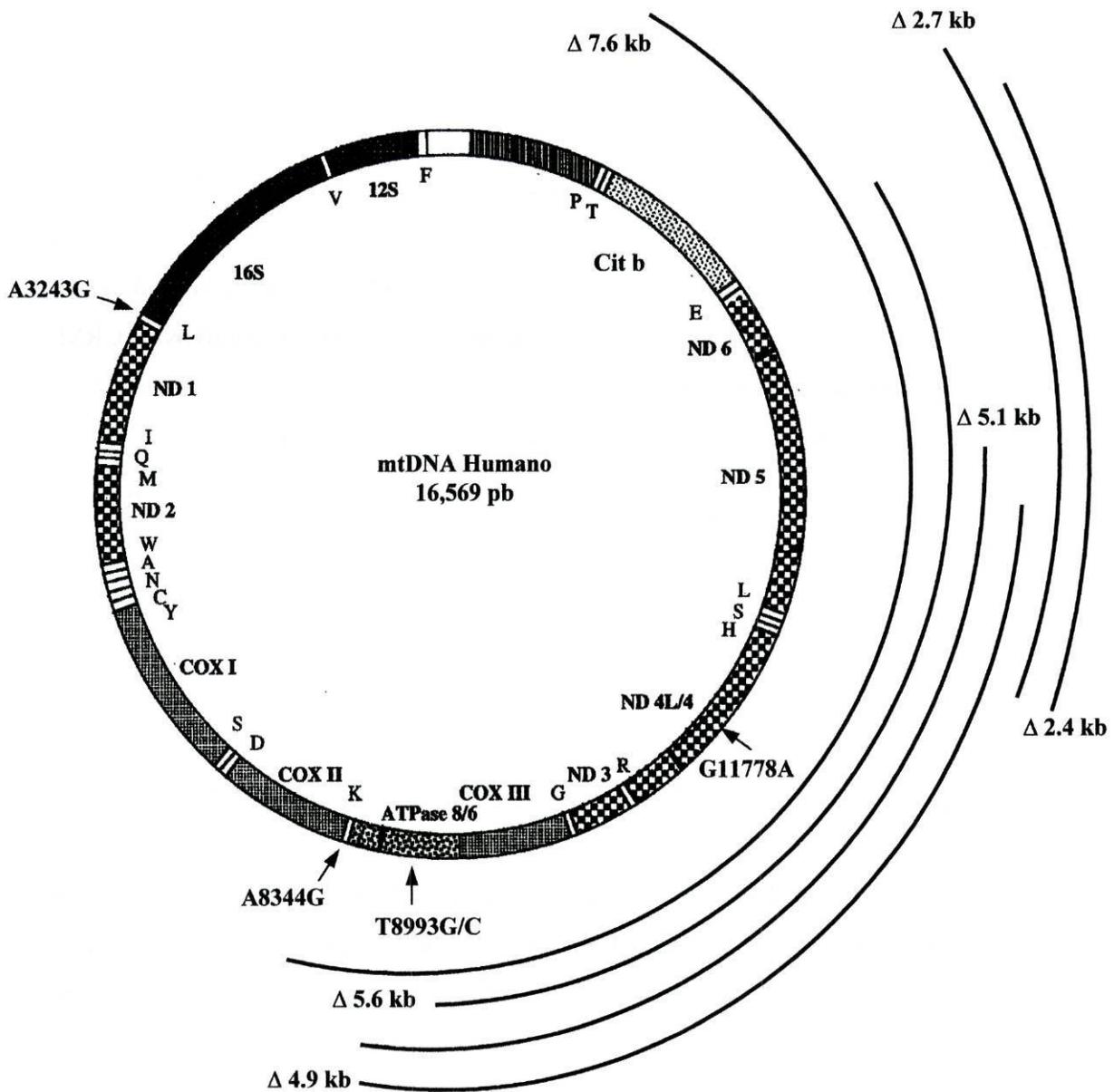


Figura 3-1 Mapa da morbilidade do mtDNA humano de acordo com o presente estudo.

### **Rearranjos de grandes dimensões (deleções/duplicações)**

Os rearranjos de grandes dimensões incluem as deleções simples, as deleções múltiplas e as duplicações. Normalmente, nos doentes ocorre unicamente um tipo de deleção com ou sem a respectiva duplicação. O músculo foi o tecido de eleição para a pesquisa de deleções, devido à sua baixa percentagem nos restantes tecidos (Zeviani *et al*, 1990).

Neste estudo, foram identificados 27 doentes com deleções simples heteroplásmicas no mtDNA ligadas a diferentes fenótipos e idades de diagnóstico, que variaram entre os 7 e os 69 anos. Esta quantidade justifica-se pelo facto da presente série integrar muitos doentes com PEO, RRFs e fibras COX negativas, o que está de acordo com os resultados encontrados por outros autores que investigaram este fenótipo (Tomé *et Fardeau*, 1986; Hirano *et DiMauro*, 1996).

A maioria das deleções foram encontradas na população adulta, sendo a idade média dos doentes com deleções de 31 anos. O mecanismo pelo qual as deleções do mtDNA aumentam com a idade pode ser o da recombinação homóloga entre as moléculas, um defeito na replicação do mtDNA (Schon *et al*, 1989; Shoffner *et al*, 1989) ou ainda devido à maior rapidez de replicação destas moléculas, em virtude de serem mais pequenas quando comparadas com a molécula não "deletada" (Larsson *et al*, 1990). Neste estudo, não foi possível demonstrar esta premissa, dado que nenhum dos doentes investigados repetiu a biópsia muscular em diferentes estadios da doença.

As deleções foram mapeadas e quantificadas pela análise de *Southern-blot*, PCR e sequenciação, apresenta dimensões compreendidas entre 8,0 e 16,0 Kb do mtDNA, o que está de acordo com a grande parte das publicações. A maioria das deleções removem pelo menos três tRNAs e dois genes estruturais (ND4 e ND5). No nosso estudo, a denominada "deleção comum" de 4977pb esteve presente em 59% dos doentes investigados demonstrando ser a deleção mais frequente do mtDNA.

Em conformidade com outros autores (Kiyomoto *et al*, 1997), não foi possível estabelecer uma correlação entre a gravidade clínica, os dados miopatológicos, o tamanho, a localização e a quantidade de deleção.

Não encontramos evidência de duplicação neste estudo. As duplicações tinham sido descritas pela primeira vez em dois doentes com KSS (Poulton *et al*, 1989<sup>a</sup>). Entretanto, Manfredi *et al*, em 1995 demonstraram que as duplicações podem ser patogénicas isoladamente.

Em seis dos restantes casos de PEO foram identificadas deleções múltiplas. Estas deleções do mtDNA foram inicialmente encontradas em doentes com PEO autossómica dominante (Zeviani *et al*, 1989) e mais tarde noutros quadros clínicos associados a uma alteração intergenómica nuclear-mitocondrial (Zeviani *et al*, 1997). Até ao momento, já foram identificados quatro loci cromossómicos distintos, mas só um gene foi caracterizado (Nishino *et al*, 1999). O espectro das manifestações clínicas e alterações moleculares específicas ainda não está completamente clarificado, o que sugere que outros factores desconhecidos influenciam o fenótipo da doença. Nos seis doentes identificados neste estudo com  $M\Delta$ mtDNA, a miopatia ocular foi o principal sintoma, associado na maioria dos casos com uma fraqueza muscular proximal grave, o que permite inferir que a PEO é o sintoma preferencial associado às  $M\Delta$ mtDNA.

Outras situações estão associadas também a  $M\Delta$ mtDNA: como as miosites de corpos de inclusão esporádicas (Oldfors *et al*, 1993; Santorelli *et al*, 1996) que são cerca de 30% das miopatias inflamatórias (como no caso do D58 que apresentou uma miopatia e que a histologia demonstrou ser uma miosite de corpos de inclusão); a PEO associada a fraqueza muscular (como nos casos dos D89 e D49); a PEO familiar com cardiomiopatia hipertrófica (como o caso D85) em que a história familiar sugere uma hereditariedade autossómica recessiva (Bohlega *et al*, 1996) e outros casos isolados com sintomatologia diversa (Ohno *et al*, 1991).

As  $M\Delta$ mtDNA podem aparecer em diferentes idades como foi comprovado com os nossos casos (8-46 anos; média 35 anos). As diferenças encontradas no envolvimento miopatológico e na percentagem dos genes mutados ainda não estão esclarecidas, mas podem estar relacionadas com genes diferentes e cinéticas distintas de fixação da deleção ou ainda com o efeito da idade (Zeviani *et al*, 1995).

Recentemente, foram identificadas mutações no gene timidina fosforilase (TP) em casos com  $M\Delta$ mtDNA envolvendo doentes com MNGIE. Este é um síndrome distinto que se transmite de modo autossómico recessivo (Hirano *et al*, 1994). A partir do caso index D32, foi efectuado o estudo familiar e identificado outro doente. Ao compararmos a família de MNGIE identificada neste estudo com as 21 famílias estudadas por Nishino *et al*, 1999 observámos que todos os doentes apresentam um fenótipo semelhante, variando a idade de apresentação e a evolução clínica.

Este síndrome pode também estar associado a uma depleção do mtDNA muscular (Papadimitriou *et al*, 1998) devido às alterações do metabolismo nucleosídeo que leva a uma deficiente replicação do mtDNA.

Em colaboração com o Prof. Hirano foi efectuado o estudo enzimático da TP do nosso doente, em leucócitos, que revelou um défice total da enzima e consequentemente um aumento da timidina de cerca de 50 vezes. Paralelamente com este estudo, foi efectuada a investigação molecular do gene que codifica aquela enzima (composta por 10 exões), localizado no cromossoma 22q13.32-qter, onde foi identificada a mutação T1464C no exão 4 que origina uma alteração S160P. Este doente foi integrado numa casuística mundial de 34 doentes com este fenótipo, todos com mutações identificadas no gene TP em homozigotia, como no nosso caso, ou em heterozigotia composta.

A idade de início da sintomatologia destes doentes é muito variada, abrangendo diferentes faixas etárias desde o lactente à idade adulta. O sintoma mais frequente e debilitante é a dismotilidade gastrointestinal, devido à disfunção neuromuscular que afecta todo o sistema entérico desde a orofaringe até ao intestino delgado (Li *et al*, 1992). A maior parte desenvolve sintomas durante a adolescência ou juventude, vindo a falecer precocemente na idade adulta. O nosso doente faleceu recentemente aos 34 anos, com uma idade semelhante à média das idades de sobrevivida (média 37,6 - intervalo 26-50) referidas no estudo do Prof. Hirano. Outro estudo que reporta a revisão de 33 casos (Debouverie *et al*, 1997) refere que 13 desses doentes faleceram com idades compreendidas entre os 3 e os 51 anos (média-26,5 anos) apresentando cerca de 50% dos doentes deleções múltiplas no mtDNA.

O papel patogénico das deleções múltiplas deve ser encarado com precaução, especialmente nos doentes mais idosos, como o caso D53, dado que esta alteração molecular pode também ser uma consequência do processo de envelhecimento (Johnston *et al*, 1995).

### **Depleção**

A depleção é um défice quantitativo do mtDNA a nível celular. A etiologia da depleção ainda não é conhecida embora tenha sido equacionado um défice do factor de transcrição mitocondrial humano (h-mtTFA) (Poulton *et al*, 1994).

As doenças hepáticas na infância, devidas a défices da CRM são relativamente raras, embora em alguns casos tenha sido identificada uma depleção do mtDNA

(Moraes *et al*, 1991; Mazziotta *et al*, 1992; Maaswinkel-Mooy *et al*, 1995). Algumas destas situações manifestaram-se e tiveram evolução fatal no período neonatal (Bakker *et al*, 1996). Assim, na expressão fenotípica dos síndromes de depleção do mtDNA, há a considerar várias categorias (Moraes *et al*, 1993): (i) de revelação precoce com falência hepática, (ii) de revelação precoce em que há um envolvimento multitecidual (incluindo miopatia) e em que o fígado está pouco afectado (caso do doente encontrado neste estudo); (iii) de revelação tardia em que a principal manifestação da doença é a miopatia e (iiii) outras (Vu *et al*, 1998).

Estes fenótipos, conforme a gravidade do quadro clínico, têm associados diferentes percentagens de depleção do mtDNA.

### Mutações pontuais

As doenças mitocondriais de transmissão materna estão associadas fundamentalmente a mutações pontuais do mtDNA. O inverso nem sempre se verifica, pois uma mutação pontual pode ser identificada num único tecido (músculo) e não ser detectável no sangue, o que significa que a linha germinativa mitocondrial não está afectada pela mutação (Tiranti *et al*, 1999). Contrariamente às deleções simples de grandes dimensões, as mutações pontuais não se acumulam com a idade (Pallotti *et al*, 1996).

As mutações do mtDNA podem estar localizadas ao nível dos genes dos tRNAs, das proteínas estruturais ou dos rRNAs. A grande maioria das mutações patogénicas são heteroplásmicas, provavelmente porque em homoplasmia resultariam numa inviabilidade do oócito ou na morte do embrião. No entanto, os doentes que apresentam formas graves da doença são em geral quase homoplásmicas para essa população do mtDNA mutado.

A mutação pontual mais comum é a transição A→G na posição 3243 do tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. Desde então, esta mutação já foi encontrada em 80% dos doentes com MELAS (Goto *et al*, 1990) descritos na literatura e em 17% de casos com outros fenótipos clínicos. Há mais de 100 casos de MELAS publicados e cerca de 80 a 90 % estão associados à mutação A3243G (Hirano *et al*, 1994).

MELAS tem sido associado a pelo menos mais oito mutações pontuais diferentes, quatro das quais localizadas no gene tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>: a A3252G, a A3260G, a T3271C, a T3291C; uma no gene tRNA<sup>Cys</sup>, a A5814G; uma no gene COXIII, a

T9957C; uma no tRNA<sup>Val</sup> a G1642A e uma no gene ND5, a G13513A. No presente estudo não encontramos nenhuma destas mutações raras, apesar de três casos com fenótipo de MELAS ainda não estarem caracterizados.

Tal como se verifica com o MELAS também o MERRF é uma entidade heterogénea sob o ponto de vista molecular. As mutações que lhe estão associadas incluem para além da mutação típica A8344G (Shoffner *et al*, 1990), a T8356C (Silvestri *et al*, 1992) e a G8363A (Ozawa *et al*, 1997) todas envolvendo o tRNA<sup>Lys</sup>.

Neste estudo, a transição A→G no nucleótido 8344 foi pesquisada na totalidade dos doentes, tendo sido encontrada em dois casos. Esta pesquisa alargada justifica-se, uma vez que vários fenótipos clínicos como por exemplo a PEO, o SL (Hammans *et al*, 1993; Santorelli *et al*, 1998) e lipomas múltiplos familiares (Silvestri *et al*, 1993; Calabresi *et al*, 1994) já foram associados a esta mutação pontual.

Para além das mutações já referidas e mais frequentes que afectam os tRNAs leucina e lisina, têm sido descritas outras mutações envolvendo os restantes tRNAs mitocondriais e que contribuem para a extrema heterogeneidade molecular característica das citopatias mitocondriais.

A LHON caracteriza-se por uma perda de visão aguda ou subaguda devido a uma atrofia óptica grave com início entre os 18 e os 30 anos e que predomina no sexo masculino (Harding *et al*, 1994). Na literatura estão referidas mais de 18 mutações do mtDNA, primárias e secundárias, associadas a este fenótipo e localizadas nos genes estruturais, sendo a maioria genes codificantes de subunidades do complexo I. Destas, foram seleccionadas as quatro mais frequentes (G11778A; G3460A; T14484C e G15257A) e pesquisadas em todos os casos com atrofia óptica. A mutação G11778A, a primeira mutação do mtDNA a ser descrita (Wallace *et al*, 1988) é a mais frequente entre as mutações primárias do mtDNA, oscilando entre 35-90% dos doentes com LHON dependendo do grupo étnico (Brown *et al*, 1994) e foi encontrada em três casos neste estudo. Para tentar avaliar a frequência desta mutação nesta população, estamos a realizar um estudo de casos de LHON em parceria com vários hospitais.

A penetrância da LHON é variável e a etiologia da doença permanece por esclarecer, equacionando-se a hipótese de mutações nucleares e factores ambientais terem um papel importante na sua expressão.

As mutações pontuais foram mais prevalentes na população pediátrica, do que as deleções. Dada a hereditariedade materna associada a estas mutações foram

investigadas as linhas maternas da maioria das famílias, à excepção de duas que eram portadoras da mutação no nt-11778 (LHON), que não desejaram ser investigadas e das famílias portadoras da mutação A8344G por inexistência de familiares vivos da linha materna.

Os nossos resultados demonstraram que as mutações A3243G e T8993G/C devem ser pesquisadas sempre que seja equacionada a hipótese de diagnóstico de citopatia mitocondrial, dado o número de doentes encontrados e de familiares portadores destas mutações, quer sintomáticos quer assintomáticos.

A variabilidade da sequência intra-individual (heteroplasmia) tem sido um critério de patogenicidade, de novas mutações do mtDNA, dado que a quase totalidade das mutações em homoplasmia são neutras e estão, na grande maioria localizadas na região controlo não codificante (*D-loop*). Dos 27 polimorfismos identificados neste estudo e confirmados segundo a reanálise da sequência da molécula do mtDNA (Andrews *et al*, 1999) só quatro foram detectados nesta região altamente polimórfica, por não ter sido uma zona muito investigada, dado o seu reduzido interesse sob o ponto de vista de patogenicidade. Efectivamente, vários estudos têm demonstrado que pequenas inserções ou deleções aparecem com alta frequência nas regiões não codificantes e podem acumular-se com a idade (Jazin *et al*, 1996; Michikawa *et al*, 1999).

Numerosas mutações do mtDNA têm sido associadas com o síndrome MELAS. Para algumas delas a relação causal com o fenótipo já foi confirmada, enquanto outras ainda são consideradas provisórias (MITOMAP, 1999). Entre as mutações do grupo "provisório" está incluída a mutação T3308C no NADH desidrogenase subunidade 1 (ND1) descrita num indivíduo espanhol afectado de MELAS com necrose bilateral do estriado (Campos *et al*, 1997). Esta mutação, heteroplásmica, substitui a metionina 1 altamente conservada por treonina e não foi detectada por Campos *et al* em 130 controlos normais nem nos doentes com défice da CRM. Contudo, o significado patológico da mutação T3308C foi questionado no decurso deste trabalho ao estudarmos 37 doentes com fenótipo clínico de encefalopatias mitocondriais e 150 controlos normais da população portuguesa. Neste estudo, a mutação T3308C foi observada em dois doentes e em quatro controlos normais, estando presente em homoplasmia.

Para definir o papel putativo desta mutação foi efectuada nos seis casos uma análise mais aprofundada do mtDNA, sendo sequenciados os vários genes dos tRNAs e as respectivas regiões vizinhas. Os resultados revelaram que mais seis mutações a T1738C, a T5655C, a G7521A, a A10398C, a A14769G e a deleção do dinucleótido na posição 514-515 estavam presentes nestes casos. Posteriormente, a título colaborativo, idêntica associação foi por nós investigada e encontrada no doente publicado por Campos *et al*, 1997.

Os resultados sugeriram que estes indivíduos deviam pertencer ao mesmo haplogrupo do mtDNA. Para identificar este haplotipo nos indivíduos com a mutação T3308C, foi sequenciada a região de controlo do mtDNA (HVR1 - high variation region) entre as posições 16090-16375. Esta análise revelou que ambos os indivíduos, portugueses e espanhóis, pertenciam ao mesmo haplogrupo L1b da África Ocidental (Watson *et al*, 1997; Rando *et al*, 1998). Por comparação com os haplogrupos L1a, L1c e L2c concluiu-se que a mutação T3308C define exclusivamente o haplogrupo L1b do mtDNA (Rocha *et al*, 1999).

Em algumas populações, é comum a eliminação da Met no codão AUA na posição 1 da subunidade ND1, o que sugere que a manutenção deste codão não é crítico na nossa espécie. Isto deve-se provavelmente, ao facto do terceiro codão (AUG) da subunidade ND1, também codificar uma metionina e a subunidade ND1 embora truncada em dois aminoácidos, se manter ainda aparentemente funcional.

Deste estudo, concluiu-se que a mutação T3308C é uma variação neutra (polimorfismo), pois não causa qualquer efeito no fenótipo.

### **3.6 Terapia e prognóstico**

Presentemente não existe terapêutica eficaz para os défices da cadeia respiratória. Os tratamentos foram efectuados em doentes sintomáticos e não alteraram a evolução da doença. Nestes doentes, deve-se evitar o tratamento das convulsões com o valproato de sódio, dado que afecta a função respiratória mitocondrial (Lam *et al*, 1997). A carnitina está a ser ensaiada na maioria dos doentes, mas sem resultados clínicos até ao momento. Presentemente, estão em curso ensaios terapêuticos com riboflavina, tiamina, biotina e Q10 (ubiquinona) em alguns doentes da neuropediatria do HMP.

Num doente com SL que apresentava hiperlactacidemias graves, foi administrado o dicloroacetato de sódio (Takanashi *et al*, 1997), para estimular a actividade da piruvato desidrogenase e diminuir o efeito tóxico do lactato com redução do número de crises convulsivas.

Ao fazer-se uma revisão da literatura verifica-se que vários ensaios têm sido levados a cabo com análogos da Q<sub>10</sub> de cadeia curta, a idebenona (Ikejiri *et al*, 1996) que é um anti-oxidante e protege a mitocôndria da acção dos radicais livres. Estudos preliminares em cinco crianças com ataxia de Friedreich, aos quais foi administrada idebenona (5mg/Kg/d oral), sugerem uma melhoria da ataxia cerebelosa e da força muscular (Rustin *et al*, 1998). Uma vez que a frataxina participa na utilização do ferro para construir os complexos da CRM, a sua deficiência leva o ferro a acumular-se, provocando formação de radicais livres e consequente destruição dos complexos da CRM.

A administração de creatina monohidratada está a ser ensaiada por alguns centros, em grupos de doentes com citopatias mitocondriais com a finalidade de tentar aumentar a força muscular.

### 3.7 Aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal

O reconhecimento e o diagnóstico atempado das doenças provocadas pelos défices da CRM são importantes para se poder fazer um aconselhamento genético a estas famílias. Apesar de alguns anos terem passado após os primeiros diagnósticos, o aconselhamento genético destas patologias nem sempre é fácil, especialmente quando se desconhece a mutação causal.

A expressão bioquímica das CM é aleatória nos fibroblastos como noutros tecidos, especialmente nos casos onde a patologia pode estar associada a um rearranjo do mtDNA. Esta característica explica a falta de fiabilidade do diagnóstico pré-natal. Alguns grupos (Ruitenbeek *et al*, 1994; 1996) têm oferecido um diagnóstico pré-natal nas famílias portadoras da mutação T8993G devido à alta percentagem de mtDNA mutado presente.

O défice em COX, o defeito mais comum na nossa casuística, provoca uma variedade de doenças neuromusculares e não neuromusculares na infância e no adulto que podem ser devidas a alterações no DNA nuclear ou mitocondrial. Isto faz com que

o aconselhamento genético dos défices da COX seja particularmente complicado. As subunidades da COX codificadas pelo mtDNA têm sido investigadas por vários grupos (Parfait *et al*, 2000), mas os resultados são negativos na sua globalidade. Provavelmente, as mutações causais estão ao nível dos genes nucleares que codificam as restantes subunidades da COX ou das proteínas envolvidas no *assembling* do complexo, o que dá um risco de 25% de recorrência.

O diagnóstico pré-natal destas patologias tem um interesse particular nas formas de apresentação neonatal e do lactente (Harper *et al*, 1993) que cursam com uma evolução clínica grave e sem opções terapêuticas. A disponibilidade de um diagnóstico pré-natal nas famílias dos propositos estudados é ainda problemática, como o comprovam as escassas referências literárias relativas ao assunto.

### **3.8 Perspectivas**

Como perspectivas de trabalho futuro, todos os esforços devem ser colocados na caracterização molecular completa dos doentes já diagnosticados. Paralelamente, prosseguiremos com o diagnóstico e caracterização de novos casos no Laboratório de Citopatias Mitocondriais da Unidade de Biologia Clínica do Instituto de Genética Jacinto de Magalhães. Este laboratório nasceu com este projecto e pretendemos continuar a prestar um bom serviço assistencial e a crescer com base na investigação.

#### **Abordagem dos casos “negativos”**

Em todos os casos com défice da CRM em que ainda não foi identificada nenhuma mutação, procederemos à análise por SSCs e sequenciação do mtDNA total numa tentativa de encontrar a mutação causal.

#### **Outros genes putativos (nucleares)**

Actualmente, alguns grupos têm focalizado a sua atenção na análise mutacional dos genes nucleares codificantes de algumas subunidades altamente conservadas durante a evolução e começa a emergir o espectro mutacional dos genes nucleares que codificam as subunidades da CRM. A primeira mutação (R544W) foi identificada no gene da subunidade succinato desidrogenase na flavoproteína (Fp) do complexo II (Bourgeron *et al*, 1995). Outras quatro foram sendo encontradas em doentes com défice

do complexo I nomeadamente uma duplicação de 5pb no gene *NDUFS4* (Van den Heuvel *et al*, 1998); as mutações "missense" V122M no gene *NDUFS7* (Triepels *et al*, 1999), P79L e R102H no gene *NDUFS8* (Loeffen *et al*, 1998) e R59X, T423M no gene *NDUFV1* (Schuelke *et al*, 1999).

Em 1998, Tiranti *et al*, descreveram várias mutações na subunidade SURF-1, gene de *assembling* da COX e adicionalmente, Papadopoulou *et al*, 1999, identificaram mutações no gene *SCO2* em três doentes com cardioencefalomiopatia fatal.

A investigação de mutações nucleares nos genes da CRM é uma área que investiremos num futuro próximo, tendo sido já efectuados contactos com a equipa holandesa que se tem debruçado na investigação mutacional do complexo I da CRM. No entanto, devido à complexidade destes longos e onerosos estudos, esta investigação só deve ser avançada após uma exclusão das mutações mais comuns do mtDNA e em casos criteriosamente pré-seleccionados.

Desde já, parece-nos importante prosseguir com o estudo familiar dos casos D34 e D37 pela sua singularidade. Efectivamente, o défice enzimático isolado do complexo III encontrado nestes dois casos, para além da sua raridade, está presente em idêntica percentagem noutra irmão destes probandos. Esta família é pois uma família de eleição para incluir num projecto de colaboração de identificação de genes nucleares candidatos para as subunidades do complexo III.

### **Outras patologias**

As doenças do metabolismo energético cardíaco, como os défices da  $\beta$ -oxidação e os défices da cadeia respiratória mitocondrial, devem ser equacionadas na investigação das cardiomiopatias "idiopáticas" quer dilatadas quer hipertróficas. As mutações mais frequentes associadas a este fenótipo têm sido pesquisadas nos doentes clinicamente pré-seleccionados mas uma abordagem molecular mais alargada poderá vir a pôr em evidência novas mutações.

É de realçar que há uma acumulação de mutações adquiridas no mtDNA com o avanço da idade, devido às alterações oxidativas cumulativas (Cortopassi *et Arnheim*, 1990; Corral-Debrinski *et al*, 1992) e nas doenças degenerativas, Parkinson, Alzheimer e esclerose amiotrófica lateral, provavelmente devido à produção de radicais livres (Shapira *et al*, 1999). É evidente o deficiente metabolismo energético e o "stress oxidativo" no cérebro destes doentes. O estudo destas patologias poderá vir a ser uma

linha de investigação nesta Unidade, se dispusermos dos meios humanos e técnicos necessários.

## **Parte IV**

---

### **Referências Bibliográficas**

- Adams PL, Lightowlers RN, Turnbull DM. Molecular analysis of cytochrome c oxidase in: Leigh's syndrome. *Ann Neurology* 1997; 41 (2): 268-270.
- Adams PL, Turnbull DM: Disorders of the electron transport chain. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 443-451.
- Altmann R. *Arch Anat Physiol* 1889, 524-536.
- Altmann R, *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den zellen*. Viet, Leipzig, 1890.
- Anan R, Nakagawa M, Miyata M, et al. A study of 17 patients with mitochondrial DNA defects. *Circulation* 1995; 91: 955-961.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290(5806): 457-65.
- André J, Marinozzi VJ *Microscopie* 1965; 4: 615-626.
- Andreu AL, Bruno C, Shanske S, Shtilbans A, Hirano M, Krishna S, Hayward L, Systrom DS, Brown RH Jr, DiMauro S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology* 1998 Nov; 51(5): 1444-7.
- Andreu AL, Bruno C, Hadjigeorgiou GM, Shanske S, and DiMauro S. Polymorphic variants in the human mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Genetics & Metabolism* 1999; 67: 49-52.
- Andrew AI, Tangik, Bruno C. et al. Exercise intolerance due to a mutation in the mtDNA ND<sub>4</sub> gene. *Ann Neurol* 1999; 45: 820-823.
- Andrews RM, et al. Reanalyse and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999, 23; (2): 147.
- Arenas J, Cabello A, and Campos Y: Aspectos bioquímicos e histoenzimáticos de las miopatías mitocondriales. *Rev Neurol* 1994; 22: 189-191.
- Argov Z, Bank WJ. Phosphorus magnetic resonance spectroscopy (31P MRS) in neuromuscular disorders. *Ann Neurol* 1991; 30(1): 90-7.
- Arnaudo E, Dalakas M, Shanske S, Moraes CT, DiMauro S, Schon EA. Depletion of muscle mitochondrial DNA in AIDS patients with zidovudine-induced myopathy. *Lancet* 1991;337(8740):508-10.
- Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annual Review of Cell Biology* 1988; 4: 289-333.
- Attardi G, Yoneda M, Chomyn A. Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271(1):241-8.
- Aynsley, Green A, Williamson DH, Gitzelmann R. The dietary treatment of glycogen synthetase deficiency. *Helv Paediatr Acta* 1977; 1: 71-75.
- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 1997 Jun 13; 276(5319): 1709-12.
- Baerlocher KE, Feldges A, Weissert M, Simonsz HJ, Rotig A. Mitochondrial DNA deletion in an 8-year-old boy with Pearson syndrome. *J Inher Metab Dis* 1992;15(3):327-30.
- Bakker HD, Van den Bogert C, Scholte HR, Zwart R, Wijburg FA, Spelbrink JN. Fatal neonatal liver failure and depletion of mitochondrial DNA in three children of one family. *J Inher Metab Dis* 1996; 19(2): 112-4.

- Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet* 1992;1(1):11-5.
- Bank W, Chance B. An oxidative defect in metabolic myopathies: diagnosis by noninvasive tissue oximetry. *Ann Neurol* 1994; 36(6): 830-7.
- Bank W, Park J, Lech G, Chance B. Near-infrared spectroscopy in the diagnosis of mitochondrial disorders. *BioFactors* 1998; 7(3): 243-5.
- Barbiroli B, Iotti S, Lodi R. In vivo assessment of human skeletal muscle mitochondria respiration in health and disease. *Mol Cell Biochem* 1997; 174 (1-2): 11-15.
- Bardosi A, Creutzfeldt W, DiMauro S, Felgenhauer K, Friede RL, Goebel HH, Kohlschutter A, Mayer G, Rahlf G, Servidei S, et al. Myo-, neuro-, gastrointestinal encephalopathy (MNGIE syndrome) due to partial deficiency of cytochrome-c-oxidase. A new mitochondrial multisystem disorder. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1987; 74(3): 248-58.
- Barrientos A, Volpini V, Casademont J, Genis D, Manzanares JM, Ferrer I, Corral J, Cardellach F, Urbano-Marquez A, Estivill X, Nunes V. A nuclear defect in the 4p16 region predisposes to multiple mitochondrial DNA deletions in families with Wolfram syndrome. *J Clin Invest* 1996<sup>a</sup> 1;97(7):1570-6.
- Barrientos A, Casademont J, Saiz A, Cardellach F, Volpini V, Solans A, Tolosa E, Urbano-Marquez A, Estivill X, Nunes V. Autosomal recessive Wolfram syndrome associated with an 8.5-kb mtDNA single deletion. *Am J Hum Genet* 1996<sup>b</sup>: 58(5):963-70.
- Behbehani AW, Goebel H, Osse G, Gabriel M, Langenbeck U, Berden J, Berger R, Schutgens RB. Mitochondrial myopathy with lactic acidosis and deficient activity of muscle succinate cytochrome-c-oxidoreductase. *Eur J Pediatr* 1984;143(1): 67-71.
- Benda C. *Arch Anat Physiol* 1898;393-398.
- Berkovic SF, Carpenter S, Evans A, Karpati G, Shoubridge EA, Andermann F, Meyer E, Tyler JL, Diksic M, Arnold D, et al Myoclonus epilepsy and ragged-red fibres (MERRF). 1. A clinical, pathological, biochemical, magnetic resonance spectrographic and positron emission tomographic study. *Brain* 1989;112 ( Pt 5):1231-60.
- Bernes SM, Bacino C, Prezant TR, et al. Identical mtDNA deletion in mother with progressive external ophthalmoplegia and son with Pearson marrow-pancreas syndrome. *J Pediatr* 1993; 123: 598.
- Bindoff LA, Turnbull DM. Defects of the respiratory chain. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1990;4(3):583-619.
- Bindoff LA, Howell N, Poulton J, McCullough DA, Morten KJ, Lightowlers RN, Turnbull DM, Weber K.. Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutation in mitochondrial DNA. A potential disease mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268(26): 19559-64.
- Birch-Machin MA, Marsac C, Ponsot G, Parfait B, Taylor RW, Rustin P, Munnich <sup>a</sup> Biochemical investigations and immunoblot analyses of two unrelated patients with na isolated deficiency in complex II of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 220:57-62.
- Blass JP, Cederbaum SD, Gibson GE. Clinical and metabolic abnormalities accompanying deficiencies in pyruvate oxidation. In: *Normal and pathological development of energy metabolism: Homme FA*, New York, Wiley-Liss, 1983; 210.
- Blaw ME, Mize CE. Juvenile Pearson syndrome. *J Child Neurol* 1990;5(3):187-90.

- Bohlega S, Tanji K, Santorelli JM, Hirano M, Al-jishi A, DiMauro S. Multiple mitochondrial DNA deletions associated with autosomal recessive ophthalmoplegia and severe cardiomyopathy. *Neurology* 1996; 46: 1329-1334.
- Bolhuis PA, Hensels GW, Hulsebos TJ, Baas F, Barth PG. Mapping of the locus for X-linked cardioskeletal myopathy with neutropenia and abnormal mitochondria (Barth syndrome) to Xq28. *Am J Hum Genet* 199;48(3):481-5.
- Bonnefont JP, Saudubray JM, Vassault. Dosage des acides lactique, pyruvique et des corps cétoniques. Application au diagnostic des hyperlactacidémies et des états d'acidocétose chez l'enfant. In: *Maladies métaboliques*. Saudubray JM. Doin Éditeurs, Paris 1991,121-140.
- Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA<sup>Lys</sup> mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am. J. Hum Genet* 1992; 51: 1187-1200.
- Bourgeois M, Goutières F, Chrétien D, Rustin P, Munnich A, Aicardi J. Deficiency in complex II of the respiratory chain presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome. *Brain Dev* 1992; 14:404-408.
- Bourgeron T, Chretien D, Rotig A, Munnich A, Rustin P. Isolation and characterization of mitochondria from human B lymphoblastoid cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;186(1):16-23.
- Bourgeron T, Rustin P, Chretien D et al., Mutation of a nuclear gene results succinate dehydrogenase: in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics* 1995; 11: 144-149.
- Breningstall GN: Approach to diagnosis of oxidative metabolism disorders. *Pediatr Neurol* 1992; 9: 81-89.
- Brown G Brown R, Scholem R et al. The clinical and biochemical spectrum of human pyruvate deshydrogenase complex deficiency. *Ann NY Acad Sci* 1989, 573:360-368.
- Brown MD, Voljavec AS, Lott ,MT, et al. Lebers's hereditary optic neuropathy: a model for mitochondrial neurogenerative diseases. *FASEB J* 1992<sup>a</sup>; 6: 2791.
- Brown MD, Voljavec AS, Lott ,MT, et al. Mitochondrial DNA complex I and III mutations with Lebers's hereditary optic neuropathy. *Genetics* 1992<sup>b</sup>; 130: 163.
- Brown MD, Yang M C-C, Trounce I, et al. A mitochondrial DNA variant, identified in Leber hereditary optic neuropathy patients, which extends aminoacid sequence of cytochrome c oxidase subunit I. *Am J Hum Genet* 1992<sup>c</sup>; 51: 378.
- Brown MD, Wallace DC. Molecular basis of mitochondrial DNA disease. *J Bioenerg Biomembr* 1994; 26: 273-289.
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991;48(1):137-44.
- Calabresi PA, Silvestri G, DiMauro S, Griggs RC: Ekbom's syndrome: lipomas, ataxia, and neuropathy with MERRF. *Muscle Nerve* 1994; 17: 943-945.
- Calabrese VP, Gruemer HD, James K, Hranowsky N, DeLorenzo RJ. Cerebrospinal fluid lactate levels and prognosis in status epilepticus. *Epilepsia* 1991;32(6):816-21.
- Campistol Plana J, Vaquerizo Madrid J, Pineda Marfà M, et al: Variable expresión del déficit de citocromo C oxidasa. *An Esp Pediatr* 1994; 41: 320-324.

- Campos Y, Martin MA, Vaamonde J, Cabello A, Esteban J, Arenas J. Clinical variability associated with the mutation at nucleotide position 8344 of the mitochondrial DNA. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 119-122.
- Campos, Y., Martin, M. A., Rubio, J. C., Gutierrez del Olmo, M. C., Cabello, A. and Arenas, J. Bilateral strial necrosis and MELAS associated with a new T3308C mutation in the mitochondrial ND1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1997<sup>a</sup>; 238(2):323-325.
- Campos, Y., Martin, M. A., Rubio, J. C., Solana, L. G., Garcia-Benayas, C., Terradas, J. L. and Arenas, J. Leigh syndrome associated with the T9176C mutation in the ATPase 6 gene of mitochondrial DNA. *Neurology* 1997<sup>b</sup>; 49(2):595-597.
- Cann RI, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987; 325: 31-36.
- Capaldi RA. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta* 1982; 694: 291-306.
- Capaldi RA. Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 569-596.
- Carelli V, Barboni P, Zacchini A, Mancini R, Monari L, Cevoli S, Liguori R, Sensi M, Lugaresi E, Montagna P. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) with 14484/ND6 mutation in a North African patient. *J Neurol Sci* 1998; 160(2):183-8.
- Carozzo R, Hirano M, Fromenty B, et al: Multiple mitochondrial DNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogenesis. *Neurology* 1998; 50: 99-106.
- Casali C., Santorelli FM, D'Amati G, et al. A novel mtDNA point mutation in maternally inherited cardiomyopathy. *Biochim Biophys Res Commun* 1995; 213: 588.
- Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Fila A, Coccozza C, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Ballabio. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 1998; 93: 937-983.
- Castro-Gago M, Novo-Rodriguez I, Garcia Caballero T, et al: Miopatía mitocondrial por déficit de los complejos III y IV. Una observación familiar. *An Esp Pediatr* 1993; 38: 82-86.
- Chalmers RA, Stanley CA, English N, Wigglesworth JS Mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase deficiency presenting as sudden neonatal death. *J Pediatr* 1997; 131(2):220-5.
- Chamberlain, S. et al. Genetic homogeneity of the Friedreich ataxia locus on chromosome 9. *Am J Hum Genet* 1996; 44: 518-521.
- Chinnery PF and Turnbull DM. Mitochondrial medicine. *Quarterly J Med* 1997; 90 (11): 657-667.
- Chomyn A, Cleeter MW, Ragan CI, Riley M, Doolittle RF, Attardi G. URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit. *Science* 1986; 234(4776):614-8.
- Chomyn A, Meola G, Bresolin N, et al. In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2236.
- Chomyn A. Mitochondrial Genetics '98. *Am J Hum Genet* 1998, 62 :745-751.
- Chomyn A, Enriquez JA, Micol V, Fernandez-Silva P, Attardi G. The MELAS syndrome-associated human mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutation causes aminoacylation

- deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J Biol Chem* 2000 (on-line).
- Chrétien D, Rustin P, Bourgeron T, Rotig A, Saudubray J M, Munnich. Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. *Clin Chim Acta* 1994, 228(1):53-70.
- Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, et al. MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol* 1992<sup>a</sup>; 31:391.
- Ciafaloni E, Ricci E, Shanske S, Moraes CT, Silvestri G, Hirano M, Simonetti S, Angelini C, Donati MA, Garcia C, Martinuzzi A, Mosewich R, Servidei S, Zammarchi E, Bonilla E, DeVivo DC, Rowland LP, Schon EA, DiMauro S. MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics. *Annals of Neurology* 1992<sup>b</sup>; 31(4): 391-397.
- Ciafaloni E, Santorelli FM, Shanske S, et al. Maternally Inherited Leigh Syndrome. *J Paediatr* 1993; 122 (3): 419-422.
- Clark JM, Marks MP, Adalsteinsson E, et al. MELAS: clinical and pathologic correlation with MRI, Xenon/CT, and MR spectroscopy. *Neurology* 1996; 46: 223-227.
- Clarkson GH, Neagle J, Lindsay JG. Topography of succinate dehydrogenase in the mitochondrial inner membrane. A study using limited proteolysis and immunoblotting. *Biochem J* 1991;273:719-24.
- Claude, A. Harvey Lectures. 1948: 43, 121-164.
- Clayton DA. Replication of a animal mitochondrial DNA. *Cell* 1982;28 (4): 693-705.
- Clayton DA. Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. *Trends Biochem Sci* 1991;16(3):107-11.
- Clayton DA. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* 1992;141:217-32.
- Collombet JM, Zobot MT, Vidailhet M, Maire I, Echenne B, Floquet J, Dumoulin R, Rimoldi M, Mathieu M, Mousson B. [Value of skin fibroblasts in culture for the diagnosis of mitochondrial cell dysfunction. A propos of 5 cases with cytochrome c oxidase deficiency]. *Pédiatrie* 1993; 48(4): 287-95.
- Cooper JM et Clark JB. The structural organization of the mitochondrial respiratory chain. In: *Mitochondrial Disorders in Neurology*, Schapira AHV. Et DiMauro S. Butterworth-Heinemann Ltd - Oxford 1994, 1-30.
- Cormier-Daire V, Bonnefont J.P.,Rustin P, et al., Mitochondrial rearrangements with onset as chronic diarrhea with villous atrophy. *J Pediatr* 1994; 124 (1): 63-70.
- Cormier-Daire V,Chrétien D, Rustin P, Bourgeron T, Rötig A, Dubisson C, Jacquemin E et al. Neonatal and delayed-onset liver involvement in disorders of oxidative phosphorylation. *J Pediatr* 1997; 130:817-22.
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 1992;2(4):324-9.
- Cortopassi GA, Arnheim N. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 1990;18(23):6927-33.
- Coudé FX, Saudubray JM, Demangre F, Marsac C, Leroux JP. Dichloroacetate as treatment for congenital lactic acidosis. *N Engl J Med* 1978 ; 299 : 1365-1360.
- Crivellone MD, Wu MA, Tzagoloff A. Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH<sub>2</sub>-cytochrome c reductase complex. *J Biol Chem* 1988;263(28):14323-33.

- Cross JH, Gadian DG, Connelly A, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies in lactic acidosis and mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis* 1993; 16: 800.
- Dalakas M, Illa I, Pezeshkpour GH, Laukaitis JP, Cohen B, Griffin JL. Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *New Engl J Med* 1990; 322: 1098-1105.
- Davis KA, Hatefi Y. Succinate dehydrogenase. I. Purification molecular properties, and molecular substructure. *Biochemistry* 1971; 10: 2509.
- Davies RE. Krebs, H.A. *Biochem Soc Symp* 1952, 8, 77-92.
- Davis RE, Miller S, Herrstadt C, Ghosh SS, Fahy E, Shinobu LA, Galasko D, Thal, LJ, Beal, MF, Howell N, Parker WDJr. Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(9): 4526-45311978.
- De Vivo DC: The expanding clinical spectrum of mitochondrial diseases. *Brain & Development* 1993 ; 15: 1-22.
- De Vivo DC, Hirano M, DiMauro S: Mitochondrial disorders, in *Handbook of Clinical Neurology*: Vinken PJ, Bruyn GK, Amsterdam, Elsevier Science BV 1996; 389-446.
- Degoul F., Diry M., François D., et al. Mitochondrial Leucine tRNA Mutation in 3 Mitochondrial Encephalomyopathies, SSIEM Annual Meeting, P-104, 1991.
- DeMeirleir L, Seneca S, Lisseus W, et al. Bilateral striatal necrosis with a novel point mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene [abstract]. *Ann Neurol* 1994; 36: 522.
- deVries D, van Engelen BGM, Grabeels FMJ, et al. A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in Leigh's syndrome. *Ann Neurol* 1993; 34: 410.
- DiMauro S, Servidei S, Zeviani M, DiRocco M, DeVivo DC, DiDonato S, Uziel G, Berry K, Hoganson G, Johnsen SD, Johnson PC. Cytochrome c oxidase in Leigh syndrome. *Ann. Neurol.* 1987; 22: 498-506.
- DiMauro S et al. Mitochondrial encephalomyopathies. *Neurol Clinic* 1990<sup>a</sup> ; 8 : 483-506.
- DiMauro S., Bonilla E., Lombes A., et al. *Ped Neurol* 1990<sup>b</sup>; 8 (3): 483.
- DiMauro S., Tonin P., and Servidei, S. Metabolic myopathies. *Handbook of Clinical Neurology* 1992; 62: 479-526.
- DiMauro S, Wallace DC (eds). *Mitochondrial DNA in Human Pathology*. Raven, New York 1993.
- DiMauro S: Mitochondrial Encephalomyopathies. In: *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease*: Rosenberg RN, Prusiner SB, et al: Boston, Butterworth-Heinemann, 1993, 665-694.
- DiMauro S, Moraes CT: Mitochondrial Encephalomyopathies. *Arch Neurol* 1993; 50: 1197-1208.
- DiMauro S, Hirano M, Bonilla E, Moraes CT and Schon EA. Cytochrome oxidase deficiency: progress and problems. In: *Mitochondrial Disorders in Neurology*, 1994, 91-115. Butterworth-Heinemann.
- DiMauro S, Hirano M, Bonilla E, Schon EA. The mitochondrial disorders. In: *Principles of Child Neurology*, New York, McGraw-Hill, 1996:1201-1232.
- DiMauro S, De Vivo DC. Genetic heterogeneity of Leigh syndrome. *Ann Neurol* 1996; 40:5-7.
- DiMauro S, Bonilla E. Mitochondrial encephalomyopathies. In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL (eds), *The molecular and genetic basis of neurological disease* (2<sup>nd</sup> edition) Boston: Butterworth-Heinemann 1997 ; 201-235.

- DiMauro S, Schon E. Mitochondrial DNA and diseases of the nervous system: the spectrum. *Neuroscientist* 1998; 4: 53-63.
- DiMauro S.: Mitochondrial encephalomyopathies: Back to mendelian genetics. *Ann Neurol* 1999; 45:693-694.
- DiMauro S, Bonilla E, De Vivo DC. Does the patient have a mitochondrial encephalomyopathy?. *J Child Neurol* 1999; 14 (Suppl 1): 523-535.
- Dougherty FE, Ernst SG, Aprille JR. Familial recurrence of atypical symptoms in an extended pedigree with the syndrome of mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *J Pediatr* 1994;125(5 Pt 1):758-61.
- Dubowitz V, Brooke MH. *Muscle Biopsy: a modern approach*. Philadelphia, Sanders, 1973.
- Ducluzeau PH, Lachaux A, Bouvier R, Streicheinberger N, stepien G, Mousson B. Depletion of mitochondrial DNA associated with infantile cholestasis and progressive liver fibrosis. *Journal of Hepatology* 1999; 30:149-155.
- Earley FGP, Ragan CI. Photoaffinity labeling of mitochondrial NADH dehydrogenase with arylazidomotphigenin, an analogue of rotenone. *Biochemical Journal* 1984; 224: 525-534.
- Egger J, Lake BD, Wilson J. Mitochondrial cytopathy. A multisystem disorder with ragged-red fibers on muscle biopsy. *Arch Dis Child* 1981; 56:741.
- El-Schahawi M, Lopez de Munain A, Sarrazin AM et al. Two large Spanish pedigrees with nonsyndromic deafness and the mtDNA mutation at nt-1555 in the 12S rRNA gene: evidence of heteroplasmy. *Neurology* 1997;48:453-456.
- Emahazion T, Beskow A, Gyllensten U, Brookes AJ. Intron based radiation hybrid mapping of 15 complex I genes of the human electron transport chain. *Cytogenet Cell Genet* 1998;82(1-2):115-9.
- Engel WK, Cunningham CG. Rapid examination of muscle tissue: na improved trichrome stain method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 1963; 13: 919.
- Ernster L, Luft R. Enzymatic activities of human skeletal muscle mitochondria : a tool in clinical metabolic research. *Nature* 1959; 184: 1851-1854.
- Estabrook RW Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol* 1967; 10:41-47
- Fenton WA. Mitochondrial protein transport. A system in search of mutations. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 235.
- Ferlin T, Guironnet G, Barnoux MC, Dumoulin R, Stepien G, Mousson B. Detection of mitochondrial DNA deletions by a screening procedure using the polymerase chain reation. *Mol Cell Biochem* 1997; 174(1-2):221-5.
- Fernandes J, Kosler JF, Grose WFA, Sorgeotrager N. Hepatic phosphorylase deficiency. Its differentiation from other hepatic glycogenoses. *Arch Dis Child* 1974; 49:186-191.
- Figarella-Branger D, Pellissier JF, Scheiner C, Wernert F, Desnuelle C. Defects of the mitochondrial respiratory chain complexes in three pediatric cases with hypotonia and cardiac involvement. *J Neurol Sci* 1992;108(1):105-13.
- Foury F, Crazalini O. Deletion of the yeast ho mologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS LETT* 1997; 411: 373-377.
- Franceschina L, Salani S, Bordoni A, Sciacco M, Napoli L, Comi GP, Prella A, Fortunato F, Hadjigeorgiou GM, Farina E, Bresolin N, D'Angelo MG, Scarlato G .A novel

- mitochondrial tRNA(Ile) point mutation in chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Neurol* 1998;245(11):755-8.
- Fu K, Hartlen R, Johns T, Genge A, Karpati G, Shoubridge EA. A novel heteroplasmic tRNA<sup>Leu</sup>(CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum Mol Genet* 1996;5(11):1835-40.
- Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 1980 Jul;47(1):117-33.
- Fukuhara N. Clinicopathological features of MERRF. *Muscle Nerve* 1995;3:S90-4.
- Garcia Silva MT, Bonnefont JP, Rotig A: Las enfermedades de la cadena respiratoria en la infancia. Presentación clínica y diagnóstico. *An Esp Pediatr* 1989 ; 31: 421-430.
- Geoffroy, G. et al. Clinical description and reontgenologic evaluation of patients with Friedreich's ataxia. *Can. J. Neurol. Sci* 1976 ; 3 : 279-286.
- Giles RE, Blanc H, Cann PM, et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 83: 9611.
- Gonzalez-Halphen D, Sindorfer MA, Capaldi RA. Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochemistry* 1988; 27: 7021.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990<sup>a</sup>; 348: 651.
- Goto Y, Itami N, Kajii N, Tochimaru H, Endo M, Horai S. Renal tubular involvement mimicking Barth syndrome in a patient with Kearns-Sayre syndrome. *J Pediatr* 1990<sup>b</sup>;116(6):904-10.
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. A new mtDNA mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys Acta* 1991; 1097: 238.
- Goto Y. Clinical features of MELAS and mitochondrial DNA mutations. *Muscle Nerve* 1992; 3: 107-112.
- Goto, Y, Tsugane, K., Tanabe, Y., Nonaka, I. and Horai, S. A new point mutation at nucleotide 3291 of the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene in a patient with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Biochim Biophys* 1994; 202: 1624-1630.
- Gray MW, Doolittle WF. Organelle Genes and Genomes. *Microbiol Rev* 1982; 46:1.
- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial Evolution. *Science* 1999; 283: 476-481.
- Green DE, Wharton DC, Tzagoloff A, Rieske JS, Brierley GP. In *Oxidases and Related Redox Systems*; King TE, Mason HS, Morrison M, Eds; Wiley: New York, 1965; Vol.II, 1032-1076.
- Grivell LA. Mitochondrial DNA. *Sci Am* 1983; 248(3): 78-89.
- Hall RE, Henriksson KG, Lewis SF, et al. Mitochondrial myopathy with succinate dehydrogenase and aconitase deficiency. Abnormalities of several iron-sulfur proteins. *J Clin Invest* 1993; 92: 2660.
- Haller RG, Lewis SF, Eastabrook RW, et al. Exercise intolerance, lactic acidosis, and abnormal cardiopulmonary regulation in exercise associated with adult skeletal muscle cytochrome c oxidase deficiency. *J Clin Invest* 1989; 84: 155.

- Haller RG, Henriksson KG, Jorfeldt L, et al. Deficiency of skeletal muscle succinate dehydrogenase and aconitase: Pathophysiology of exercise in a novel human muscle oxidative defect. *J Clin Invest* 1991; 88: 1197.
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, et al. Mitochondrial encephalomyopathies: molecular genetic diagnosis from blood samples. *Lancet* 1991; 337: 1311.
- Hammans SR, Sweeney M, Holt I, et al. Evidence for intramitochondrial complementation between deleted and normal mitochondrial DNA in some patients with mitochondrial myopathy. *J Neuro Sci* 1992; 107: 87-92.
- Hammans SR, Sweeney MG, Brockington M, Lenox GG, Lawton NF, Kennedy CR, Morgan-Hughes JÁ, Harding AE: The mitochondrial DNA transfer RNA<sup>Lys</sup> A→G<sup>(8344)</sup> mutation and the syndrome of myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF). Relationship of clinical phenotype to proportion of mutant mitochondrial DNA. *Brain* 1993; 116: 617-632.
- Hammans SR, Morgan-Hughes JA. Mitochondrial myopathies: clinical features, investigation, treatment and genetic counselling. In: Schapira AHV, DiMauro S, editors. *Mitochondrial disorders in neurology*. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1994: 49-74.
- Hammans SR, Sweeney MG, Hanna MG, Brockington M, Morgan-Hughes JA, Harding AE. The mitochondrial DNA transfer RNA<sup>Leu(UUR)</sup> A→G (3243) mutation: A clinical and genetic study. *Brain* 1995; 118: 721-734.
- Hanna MG, Nelson I, Sweeney MG, Cooper JM, Watkins PJ, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Congenital encephalomyopathy and adult-onset myopathy and diabetes mellitus: different phenotypic associations of a new heteroplasmic mtDNA tRNA glutamic acid mutation. *Am J Hum Genet* 1995; 56(5): 1026-1033.
- Hao H, Bonilla E, Manfredi G, DiMauro S, Moraes CT. Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 1995; 56(5): 1017-1025.
- Harding AE. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering features. *Brain* 1981; 104: 598-660.
- Harding AE, Genetic Aspects of Mitochondrial Encephalomyopathies, *Rev. Neurol.* - Barcelona 1994; 22 (114): 186-188.
- Harper S. *Practical Genetic Counseling*. Oxford Butterworth-Heinemann, 1993.
- Hatefi Y, Haavik AG, Griffiths DE. Studies on the electron transfer system. *The Journal of Biological Chemistry* 1962; 237: 1676-1680.
- Hatefi Y, Galante YM. Isolation of cytochrome b560 from complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) and its constitution with succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1980; 255: 5530.
- Hatefi Y, The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:1015-1069.
- Hattori Y, Goto Y, Sakuta R, Nonaka I, Mizuno Y, Horai S. Point mutations in mitochondrial tRNA genes: sequence analysis of chronic progressive external ophthalmoplegia. *J Neuro Sci* 1994;125(1):50-5.
- Hartzog PE, Garder JL, Cain BD. Modeling the Leigh syndrome nt-8993 T→C mutation in *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1999; 31:769-776.

- Herzberg N.H., Van Schooneveld M.J., Bleeker-Wagemakers E.M., et al., Kearns-Sayre Syndrome with a Phenocopy of Choroideremia Instead of Pigmentary Retinopathy. *Neurology* 1993; 43: 218-221.
- Hirano M, Ricci E, Koenigsberger MR, Defendini R, Pavlakis SG, DeVivo DC, DiMauro S, Rowland LP. MELAS: An original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromusc. Disord.* 1992; 2(2): 125-135.
- Hirano M, Pavlakis SG. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): current concepts. *J. Child. Neurol.* 1994; 9: 4-13.
- Hirano M, DiMauro S. Clinical features of mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. In: *Handbook of muscle disease*. Lane RJM, New York, Marcel Dekker 1996; 479-504.
- Hirano M, Silvestri G, Blake DM, Lombes A, Minetti C, Bonilla E, Hays AP, Lovelace RE, Butler I, Bertorini TE, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1997 ; 44:721-727.
- Hirano M, Garcia-de-Yébenes J, Jones AC, Nishino I, DiMauro S, Carlo JR, Bender AN, Hahn AF, Salberg LM, Weeks DE, Nygaard TG. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter. *Am J Hum Genet* 1998; 63(2):526-33.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-719.
- Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, et al. Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 1989<sup>a</sup>; 26: 699.
- Holt IJ, Harding AE, Cooper JM, Schapira AHV, Toscano A, Clark JB, et al. Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA. *Ann Neurol* 1989<sup>b</sup>; 26: 699-708.
- Holt IJ, Harding AE, Petty RKH, et al. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990; 46: 428-483.
- Houshmand M, Lindberg C, Moslemi AR, Oldfors A, Holme E. A novel heteroplasmic point mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene in a sporadic case of mitochondrial encephalomyopathy: de novo mutation and no transmission to the offspring. *Hum Mutat* 1999;13(3):203-9.
- Howell N. Origin, cellular expression, and cybrid transmission of mitochondrial CAP-R, PYR-IND, and OLI-R mutant phenotypes. *Somatic Cell Genet* 1983 ;9(1):1-24.
- Howell N, Kubacka I, Xu N, et al. Leber hereditary optic neuropathy; involvement of the mitochondrial NDI gene and evidence for an intragenic suppression mutation. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 935.
- Howell N, Kubacka I, Smith R, Frerms F, Parks JK, Parker WDJr. Association of the mitochondrial 8344 MERRF mutation with maternally inherited spinocerebellar degeneration and Leigh disease. *Neurology* 1996; 46 (1): 219-222.
- Huoponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *Am J Hum Genet* 1991; 48(6):1147-1153.
- Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, Stoneking M, Saha N, Arnos C, Cortopassi G. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 1993;21(18):4174-9.

- Ikejiri Y, Mori E, Ishii K, Nishimoto K, Yasuda M, Sasaki M. Idebenone improves cerebral mitochondrial oxidative metabolism in patient with MELAS. *Neurology* 1996; 47: 583-585.
- Inui K., Tsukamoto H., Fukushima H., et al. Detection of A→G (3243) Mutation of mtDNA in Japanese Families With Mitochondrial Encephalomyopathies, SSIEM Annual Meeting, P-103, 1991.
- Jackson MJ, Schaefer JA, Johnson MA, Morris AA, Turnbull DM, Bindoff LA. Presentation and clinical investigation of mitochondrial respiratory chain disease. A study of 51 patients. *Brain* 1995;118 ( Pt 2):339-57.
- Jaksch M, Hofmann S, Kleinle S, Liechti-Gallati S, Pongratz DE, Müller-Höcker J, Jedele KB, Meitinger D, Gerbitz K-D. A systematic mutation screen of 10 nuclear and 25 mitochondrial candidate genes in 21 patients with cytochrome c oxidase (COX) deficiency shows tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> mutations in a subgroup with syndromal encephalopathy. *J Med Genet* 1998; 35: 895-900.
- Jazin EE, Cavelier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(22):12382-7.
- Jeong-Yu S, Clayton DA: Regulation and function of the mitochondrial genome. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 443-451.
- Johns DR, Rutledge SL, Stine OC, et al. Directly repeated sequences associated with pathogenic mitochondrial DNA deletions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8059.
- Johns DR, Hurko O. Mitochondrial leucine tRNA mutation in neurological diseases. *Lancet* 1991<sup>a</sup>, 13; 337(8746): 927-8.
- Johns DR, Berman J. Alternative, simultaneous complex I mitochondrial DNA mutation in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991<sup>b</sup>; 174: 1324.
- Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1992<sup>a</sup>; 187: 1551.
- Johns DR, Smith KH, Miller NR. Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 3460 mutation. *Arch Ophthalmol* 1992<sup>b</sup>; 110(11): 1577-81.
- Johns DR, Neufeld MJ, Hedges TR. Mitochondrial DNA mutations in Cuban optic and peripheral neuropathy. *J Neuroophthalmol* 1994 Sep; 14(3): 135-40.
- Johnston W, Karpati G, Carpenter S, Arnold D, Shoubridge EA. Late-onset mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1995; 37: 16-23.
- Jun AS, Brown MD, Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at np 14459 of the ND6 gene associated with maternally inherited Leber's hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(13): 6206-6210.
- Kadenbach B, Jarausch J, Hartmann R, Merle P. Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal Biochem* 1983;129(2):517-21.
- Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y et al. A subtype of diabetes mellitua associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1994; 330-962-968.
- Kagawa Y, Racker E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. X. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. *J Biol Chem* 1966;241(10):2475-82.

- Kaufmann P, Koga Y, Shanske S et al. Mitochondrial DNA and RNA processing in MELAS. *Ann Neurol* 1996; 40: 172-180.
- Kaukonen, J., Amati, P., Suomalainen, A., Rotig, A., Antozzi, C., Salvi, F., Weissenbach, J., Peltonen, L. and Zeviani, M.. "Identification of a second autosomal locus predisposing to multiple deletions of mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 1995; 57(4): A216 (abstract 1246).
- Kaukonen JA, Amati P, Suomalainen A, Rotig A, Piscaglia MG, Salvi F, Weissenbach J, Fratta G, Comi G, Peltonen L, Zeviani M. An autosomal locus predisposing to multiple deletions of mtDNA on chromosome 3p. *Am J Hum Genet*; 1996; 58(4):763-9.
- Kaukonen J, Zeviani M, Comi GP, Piscaglia MG, Peltonen L, Suomalainen A. A third locus predisposing to multiple deletions of mtDNA in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Am J Hum Genet* 1999 Jul; 65(1): 256-61.
- Kearns TP, Sayre GP. Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block. *Arch Ophthalmol* 1958; 60: 280-289.
- Keightley JA, Hoffbuhr KC, Burton MD, Salas VM, Johnston WS, Penn AM, Buist NR, Kennaway NG. A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet* 1996;12(4):410-6.
- Keilin D. On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1925; 98:312-339.
- Kholodenko BN. Control of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Theor Biol* 1984 Mar 21;107(2):179-88.
- Klingenberg M, Hackenberg H, Kramer R, Lin CS, Aquila H. Two transport proteins from mitochondria: I. Mechanistic aspects of asymmetry of the ADP, ATP translocator, II. The uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 358: 83-95.
- Kobayashi Y, Momo MY, Tominaga K, et al. A point mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 1990; 173: 816-822.
- Kochel HG, Kuntzel H. Nucleotide sequence of the *Aspergillus nidulans* mitochondrial gene coding for the small ribosomal subunit RNA: homology to *E. coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res* 1981 Nov 11; 9(21): 5689-96.
- Koga Y, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H. *Am J Hum Genet* 1995, 57 :338.
- Korenke G, Bentlage H, Ruitenbeek W, et al. Isolate and combined deficiencies of NADH dehydrogenase (complex I) in muscle tissue of children with mitochondrial myopathies. *Eur J Pediatr* 1990; 150:104-108.
- Koutnikova, H. Campuzano V, Foury F et al. Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 1997; 16: 345-351.
- Kroon AM, Van Den Bogert C. Biogenesis of Mitochondria and Genetics of Mitochondrial Defects. *J. Inher. Metab. Dis* 1987; 10 (Suppl.1): 54-61.
- Laforet P, Lombes A, Eymard B, et al. Chronic progressive external ophthalmoplegia with ragged-red fibers: clinical morphological and genetic investigations in 43 patients. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 399.
- Lamminen T, Majander A, Juvonen V, Wikstrom M, Aula P, Nikoskelainen E, Savontous ML. A mitochondrial mutation at nt 9101 in the ATP synthase 6 gene associated with

- deficient oxidative phosphorylation in a family with Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Hum Genet* 1995; 56(5): 1238-40.
- Larsson GN, Holme E, Kristiansson B, et al. Progressive increase of mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 1990; 28: 131-136.
- Larsson NG, Anderson O, Holme E, et al. Leber's hereditary optic neuropathy and complex I deficiency in muscle. *Ann Neurol* 1991; 300:701-708.
- Leigh D. subacute necrotizing encephalomyelopathy in na infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1951; 14:216-221.
- Lehninger Al. *The mitochondrion*; Benjamin: New York, 1964.
- Lehninger AL. Bioenergetic principles and the ATP cycle. In: *Biochemistry* (Lehninger AL, eds) 1982:361-396 and 467-510. Worth Publishers, Inc., New York.
- Lertrit P, Noer AS, Byrne E, Marzuki S. Tissue segregation of a heteroplasmic mtDNA mutation in MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers) encephalomyopathy. *Hum Genet* 1992 Nov; 90(3): 251-4.
- Linke P, Wiess H. Reconstitution of ubiquinol-cytochrome c reductase from *Neurospora* mitochondria with regard to subunits I and II. *Methods Enzymol* 1986; 126: 201.
- Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R, Trijbels F et al. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1598-1608.
- Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, Janssen A, Tripels R, Sengers R, van den Heuvel. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetics aspects. *Human Mutation* 2000; 15:123-134.
- Lombés A, Mendell JR, Nakase H, et al: Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers with cytochrome oxidase deficiency: neuropathology, biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol* 26: 20-33, 1989.
- Luder A, Barash V. Complexe I Deficiency with Diabetes, Fanconi Syndrome and mtDNA Deletion. *J Inher Metab Dis* 1994; 17: 298-300.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius BA. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 1962; 41: 1776-1804.
- Luft R. The development of mitochondrial medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8731-8738.
- Luis JR, Caeiro B. Application of two STRs (VWA and TPO) to human population profiling; survey in Galicia. *Hum Biol* 67: 789-795.
- Lundegårdh H *ArkivBot* 1945; 32<sup>A</sup>(12):1-139.
- Lutsenko S, Cooper MJ. Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998; 95: 6004-6009.
- Maaswinkel-Mooy PD et al. Lactic acidemia and hypoketotic hypoglycemia due to mitochondrial DNA depletion in the liver. Abstract 33rd Annu Symp SSIEM Toledo, Spain, 1995 P-173.
- Mackey D, Howell N. A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology. *Am J Hum Genet* 1992; 51(6): 1218-28.

- Macmillan CJ, Lach B, Shoubridge EA. Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA<sup>Leu[3243]</sup>) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: The role of mitotic segregation. *Neurology* 1993; 43: 1586-1590.
- Macmillan CJ, Shoubridge EA. Mitochondrial DNA depletion: prevalence in a pediatric population referred for neurologic evaluation. *Pediatr Neurol* 1996;14(3):203-10.
- Makino M, Horai S, Goto Y, Nonaka I. Mitochondrial DNA mutations in Leigh syndrome and their phylogenetic implications. *J Hum Genet* 2000 45;69-75.
- Manfredi G, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S, Moraes C. A mitochondrial DNA missense mutation in the cytochrome oxidase subunit III gene associated with a progressive encephalopathy. *Miami Short Reports* 1994; 4:17.
- Manfredi G, Schon EA, Moraes CT, et al. A new mutation associated with MELAS is located in a mitochondrial DNA polypeptide-coding gene. *Neuromuscul Disord* 1995; 5: 391.
- Manfredi G, Schon EA, Bonilla E, Moraes CT, Shanske S, DiMauro S. Identification of a mutation in the mitochondrial tRNA(Cys) gene associated with mitochondrial encephalopathy. *Hum Mutat* 1996; 7(2): 158-63.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 1982 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Margulis L S, On the origin of mitosing cells. *J Theoret Biol* 1967; 14: 225.
- Margulis L S. *Origin of eukaryotic cells*. Yale Univ. Press, New Haven, CT; 1970.
- Margulis L S. *Symbiosis in cell evolution*. Freeman, San Francisco 1981.
- Marin-Garcia J, Ananthakrishnan R, Goldenthal MJ, Filiano JJ, Sarnat HB. Skeletal muscle mitochondrial defects in nonspecific neurologic disorders. *Pediatr Neurol* 1999; 21: 538-542.
- Marzuki S, Noer AS, Lertrit P, Thyagarajan D, Kapsa R, Utthanaphol P, Byrne E. Normal variants of human mitochondrial DNA and translation products: the building of a reference data base. *Hum Genet* 1991;88(2):139-45.
- Masucci JP, Davidson M, Koga Y, et al. In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> gene: two genotypes produce similar phenotypes. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2872.
- Matsura N, Suzuki S, Yokota Y, Kazahari K, Kazahari M, Toyota T, Hirai M, Okuno A, Harada S, Fukushima N, Koike A, Ito Y, Hotsubo T. The prevalence of mitochondrial gene mutations in childhood diabetes in Japan. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 1999; 12(1):27-30.
- Mazzella M, Cerone R, Bonacci W, Caruso U, Munnich A, Rustin P, Saudubray J M, Romano C, Serra G. Severe complex I deficiency in a case of neonatal-onset lactic acidosis and fatal liver failure. *Acta Pediatr* 1997; 86(3): 326-329.
- Mazziotta MRM, Ricci E, Bertini E, et al., Fatal infantile liver failure associated with mitochondrial DNA depletion. *J Pediatr* 1992;121:896-901.
- McMahon FL, Stine OC, Meyers DA, et al., Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1277.
- Merante F, Petrova-Benedict P, MacKay N, et al. A biochemically distinct form of cytochrome c oxidase deficiency in Sanguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 481-487.
- Merante F, Tein I, Benson L, Robinson BH. Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA(glycine) gene. *Am J Hum Genet* 1994;55(3):437-46.

- Merante F, Myint T, Tein I, Benson L, Robinson BH. An additional mitochondrial tRNA(Ile) point mutation (A-to-G at nucleotide 4295) causing hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mutat* 1996;8(3):216-22.
- Mhiri C, Baudrimont M, Bonne G, Geny C, Degoul F, Marsac C, Roullet E, Gherardi R. Zidovudine myopathy: a distinctive disorder associated with mitochondrial dysfunction. *Ann Neurol* 1991; 29(6):606-14.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999;286(5440):774-9.
- Mitchell P. Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 1976;62(2):327-67.
- Mitchell P. Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome. *N Engl J Med* 1989; 320: 1293-1299.
- Miyabayashi S, Hanamizu H, Endo H, Tada K, Horai S. A new type of mitochondrial DNA deletion in patients with encephalomyopathy. *J Inherit Metab Dis* 1991;14(5):805-12.
- Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M et al., Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Eng J Med* 1989; 320: 1293-1299.
- Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andretta F, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S. mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *Am J Hum Genet* 1991<sup>a</sup>; 48(3):492-501.
- Moraes CT, Zeviani M, Schon EA, et al. Mitochondrial DNA deletion in a girl with manifestations of Kearns-Sayre and Lowe syndromes: an example of phenotypic mimicry? *Am J Med Genet* 1991<sup>b</sup>; 41: 301-305.
- Moraes CT, Ricci E, Petruzzella V, et al. Molecular analysis of muscle pathology associated with mitochondrial DNA deletions. *Nature Genet* 1992; 1: 359-367.
- Moraes CT, DiMauro S, Schon E. Mitochondrial diseases : defects of mitochondrial DNA. *New Trends in Paediatric Neurology* 1993<sup>a</sup>; 227-231.
- Moraes CT, Ciacci F, Silvestri G, et al. Atypical clinical presentation associated with the MELAS mutation at position 3243 of human mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disorders* 1993<sup>b</sup>; 3: 43.
- Moraes CT, Ricci E, Arnaudo E, et al. Quantitative Defects of Mitochondrial DNA. In: *Mitochondrial DNA in Human Pathology*, New York, Raven Press Ltd 1993<sup>c</sup>, 8: 97-108.
- Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, et al. Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. *J Clin Invest* 1993<sup>d</sup>; 92: 2906.
- Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, et al. A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nature Genet* 1993<sup>e</sup>; 4: 284.
- Moraes CT. Mitochondrial DNA depletion in human pathology. *Int Pediatr* 1993<sup>f</sup>;8:40-44.
- Morgan-Hughes. Mitochondrial myopathies. In Engel & Franzini-Armstrong, eds. *Myology*. McGraw-Hill, New York 1997; 1610-1660.
- Morris AA, Leonard JV, Brown GK, Bidouki SK, Bindoff LA, Woodward CE, Harding CE, Harding AE, et al. Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. *Ann Neurol* 1996; 40:25-30.

- Morten KJ, Cooper JM, Brown GK, Lake BD, Pike D, Poulton J. A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. *Hum Mol Genet* 1993; 2(12): 2081-7.
- Munnich A, Rustin P, Rotig A, et al: Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 448-455.
- Munnich A, Rötig A, Chretien D, Saudubray JM, Cormier V, Rustin P. Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inher Metab Dis* 1996;19: 521-527.
- Nakamura M, Nakano S, Goto Y, Ozawa M, Nagahama Y, Fukuyama H, Akiguchi I, Kaji R, Kimura J. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214(1):86-93.
- Nass S, Nass MMK Intramitochondrial fibers with DNA Characteristics. *J Cell Biol*, 1963; 19: 593-629.
- Nelson I, Hanna MG, Alsanjari N, Scaravilli F, Morgan-Hughes JA, Harding AE. A new mitochondrial DNA mutation associated with progressive dementia and chorea: a clinical, pathological, and molecular genetic study. *Ann Neurol* 1995 Mar; 37(3): 400-3.
- Nikoskelainen EK, Savontaus ML, Wanne OP, Katila MJ, Nummelin KU. Leber's hereditary optic neuroretinopathy, a maternally inherited disease. A genealogic study in four pedigrees. *Arch Ophthalmol* 1987 May;105(5):665-71.
- Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999; 283:689-692.
- Norby S, Diagnostic mtDNA Analysis by PCR With Allele-specific Priming, SSIEM Annual Meeting, P-102, 1991.
- Ohnishi T, Trumpower BL: Differential effects of antimycin on ubiquinone bound in different environments in isolated succinate cytochrome reductase complex. *J Biol Chem* 1980; 255: 3278.
- Ohnishi T, Ragan CI, Hatefi Y. EPR studies of iron-sulfur clusters in isolated subunits and subfractions of NADH-ubiquinone oxidoreductase. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260: 2782-2788.
- Ohno K, Tanaka M, Ino H, Suzuki H, Tashiro M, Ibi T, Sahashi K, Takahashi A, Ozawa T. Direct DNA sequencing from colony: analysis of multiple deletions of mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta* 1991;1090(1):9-16.
- Ohtsuka Y, Amano R, Oka E, Ohtahara S. Myoclonus epilepsy with ragged-red fibers: a clinical and electrophysiologic follow-up study on two sibling cases. *J Child Neurol* 1993; 8(4): 366-72.
- Olsson C, Zethelius B, Lagerström-Fermér M, asplund J, Berne C, Landegren U. Level of heteroplasmy for the mitochondrial mutation A3243G correlates with age at onset of diabetes and deafness. *Hum Mutation* 1998; 12: 52-58.
- Okamura K, Santa T, Nagae K, Omae T. Congenital oculoskeletal myopathy with abnormal muscle and liver mitochondria. *J Neurol Sci* 1976; (1):79-91.
- Ozawa T, Sugiyama S, Tanaka M, Hattori K. Mitochondrial DNA mutations and disturbances of energy metabolism in myocardium. *Jpn Circ J* 1991;55(11):1158-64.

- Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1995, 24;1271(1):177-89.
- Palade GE. *J Histochem Cytochem* 1953; 1: 188-211.
- Pallotti F, Chen X, Bonilla E, Schon EA. Evidence that specific mtDNA point mutations may not accumulate in skeletal muscle during normal human aging. *Am J Hum Genet* 1996; 59(3): 591-602.
- Pandolfo M. Molecular genetics and pathogenesis of Friedreich ataxia. *Neuromusc Disorders* 1998; 8: 409-415.
- Papa S, Sardanelli AM, Cocco T, Speranza F, Scacco SC, Technichova- Dobrova Z. The nuclear encoded 18KDa (Ip) subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 1996; 379: 299-301.
- Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock et al. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nature genetics* 1999, 23 ; (3): 333-337.
- Parfait B, Percheron A, Chrétien, Rustin P, Munnich A, Rotig A. No mitochondrial cytochrome oxidase (COX) gene mutations in 18 cases of COX deficiency. *Hum Genet* 1997; 101: 247-250.
- Parfait B, Chrétien D, Rötig A, Marsac C, Munnich A and Rustin P. Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Human Genetic* 2000 (on line).
- Parrot-Roulard F, Carre M, Lamireau T, et al. Fatal neonatal hepatocellular deficiency with lactic acidosis defect of the respiratory chain. *J Inher Metab Dis* 1991; 14: 289-292.
- Passarino G, Semino RI, Modiano G and Santachiara-Benerecetti AS. "COII/ tRNALys intergenic 9-bp deletion and other mtDNA markers clearly reveal that the Tharus (Souther Nepal) have oriental affinities". *American Journal of Human Genetics* 1993; 53: 609-618.
- Pastores GM, Santorelli JM, Shanske, Gelb BD, et al. Leigh syndrome and hypertrophic cardiomyopathy in na infant with a mitochondrial DNA point mutation (T8993G). *Am J Med Genet* 1994, 50:265-271.
- Pavlakakis SG, Phillips PC, DiMauro S, et al. Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and strokelike episodes: A distinctive clinical syndrome. *Ann. Neur.* 1984; 9: 481-488.
- Petruzzella V, Moraes CT, Sano MC, et al. Extremely high levels of mutant mtDNA co-localize with cytochrome c oxidase-negative ragged-red fibers in patients harboring a point mutation at nt-3243. *Hum Mol Genet* 1994; 3:449-454.
- Petty RKH, Harding AE, Morgan-Hughes JA. The clinical features of mitochondrial myopathy. *Brain* 1986; 109;915-938.
- Poggi-Travert F, Martin D, Billette De Villemeur T, et al. Metabolic intermediates in lactic acidosis: compounds, samples and interpretation. *J Inher Metab Dis* 1996 ; 19: 478-488.
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 1998;20(3):291-3.
- Polyak K, Vogelstein B. 1999 ; MITOMAP mtDNA Sequence Data.

- Porter JD, Baker RS. Muscles of a different 'color': the unusual properties of the extraocular muscles may predispose or protect them in neurogenic and myogenic disease. *Neurology* 1996;46(1):30-7.
- Poulton J, Deadman ME, Gardiner RM. Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. *Lancet* 1989; 1: 236-240.
- Poulton J, Deadman ME, Ramacharan S, et al. Germ-line deletions of mtDNA in mitochondrial myopathy. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 649.
- Poulton J, Morten K, Freeman-Emerson C, et al. Deficiency of human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1763-1769.
- Poulton J, Sewry C, Potter C, et al. Variation in mitochondrial levels in muscle from normal controls: Is depletion of mtDNA in patients with mitochondrial myopathy a distinct clinical syndrome? *J Inherit Metab Dis* 1995; 18: 4-20.
- Prezant TR, Agopian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet* 1993 Jul; 4(3): 289-94.
- Prick MJJ, Gabreels FJM, Renier Wo, et al. Progressive infantile poliodystrophy. Association with disturbed pyruvate oxidation in muscle and liver. *Arch Neurol* 1981; 38: 767.
- Prochaska LJ, Bisson R, Capaldi RA, Steffens GC, Buse G. Inhibition of cytochrome c oxidase function by dicyclohexylcarbodiimide. *Biochim Biophys Acta* 1981;637(2):360-73.
- Rabier D, Kamoun P. Metabolism of citrulline in man. *Amino acids* 1995; 9:299-316.
- Rabier D, Diry C, Rotig A, Rustin P, Heron B, Bardet J, Parvy P, Ponsot G, Marsac C, Saudubray JM, Munnich A, Kamoun P. Persistent hypocitrullinaemia as a marker for mtDNA NARP T 8993 G mutation? *J Inherit Metab Dis* 1998;21(3):216-9.
- Ragan CI, Galante YM, Hatefi Y. Purification of three iron-sulfur proteins from the iron-protein fragment of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochemistry* 1982; 21: 2518.
- Ragan CI. Structure of NADH-ubiquinone reductase (complex I). *Current Topics in Bioenergetics* 1987; 15: 1-36.
- Rahman S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, Christodoulou J, Thorburn DR. Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 1996; 39(3):343-5.
- Reichman H, Rohkamm R, Zeviani M, et al. Mitochondrial myopathy due to complex III deficiency with normal reduced cytochrome b concentration. *Arch Neurol* 1986; 43: 9587.
- Reichmann H, Angelini C. Single muscle fibre analyses in 2 brothers with succinate dehydrogenase deficiency. *Eur Neurol* 1994; 34:95-98.
- Reid FM, Vernham GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 1994; 3(3): 243-7.
- Remes AM, Majamaa K, Herva R, Hassinen IE. Adult-onset diabetes mellitus and neurosensory hearing loss in maternal relatives of MELAS patientes in a family with the tRNA<sup>LEU(UUR)</sup> mutation. *Neurology* 1993; 43: 1015-1020.
- Ribes A, Riudor E, Valcarel R, Salva A, Castello F, Murillo S, Dominguez C, Rotig A, Jakobs C. Pearson syndrome: altered tricarboxylic acid and urea-cycle metabolites, adrenal insufficiency and corneal opacities. *J Inherit Metab Dis* 1993;16(3):537-40.

- Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 1998;26(4):967-73.
- Rieske JS. Composition, structure, and function of complex III of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1976; 456: 195.
- Riggs JE, Schochet SS, Fakadej AV, Papadimitriou A, DiMauro S, Crosby TW, Gutmann L, Moxley RT. Mitochondrial encephalomyopathy with decreased succinate-cytochrome c reductase activity. *Neurology* 1984; 34: 48.
- Rivner MH, Shamsnia M, Swift TR, Trefz J, Roesel RA, Cater AL, Yanamura W, Hommes FA, Kearns-Sayre syndrome and complex II deficiency. *Neurology*, 1989; 39:693-696.
- Robertson DE, Dutton PL. The nature and magnitude of the charge reparation reactions of ubiquinol cytochrome c<sub>2</sub> oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 1988; 935: 273.
- Robinson BH, Raylor J, Sherwood WG. The genetic heterogeneity of lactic acidosis: occurrence of recognizable inborn errors of metabolism in pediatric population with lactic acidosis. *Pediatr Res* 1980; 14: 916-926.
- Robinson BH, De Meirleir L, Glerum M, Sherwood G, Becker L. Clinical presentation of mitochondrial respiratory chain defects in NADH-coenzyme Q reductase and cytochrome oxidase: clues to pathogenesis of Leigh disease. *J Pediatr* 1987<sup>a</sup>; 110(2):216-22.
- Robinson BH, Oei J, Saudubray JM, Marsac C, Bartlett K, Quan F, Gravel R. The French and North American phenotypes of pyruvate carboxylase deficiency. Correlation with biotin containing protein by <sup>3</sup>H-biotin incorporation, <sup>35</sup>S-streptavidin labeling, and Northern blotting with cloned cDNA probe. *Am J Hum Genet* 1987<sup>b</sup>; 40: 50-59.
- Robinson BH. Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* 1998;1364(2):271-86.
- Rocha H, Flores C, Campos Y, Arenas J, Vilarinho L, Santorelli FM, Torroni A. About the "pathological" role of the mtDNA T3308C mutation... *Am J Hum Genet* 1999; 65 (5):1457-1459.
- Romero NB, Lombès A, Touati G, et al: Morphological studies of skeletal muscle in lactic acidosis. *J Inher Metab Dis* 1996; 19: 528-534.
- Rötig A, Colonna M, Bonnefont JP, Blanche S, Fischer A, Saudubray JM, Munnich A. Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* 1989; 22;1(8643):902-3.
- Rötig A, Cormier V, Blanche S et al. Pearson's marrow-pancreas syndrome: a multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest* 1990; 86: 1601-1608.
- Rötig A, Cormier V, Saudubray JM, Munnich A. Les cytopathies mitochondriales: les nouvelles maladies de système. In *Maladies Métaboliques*, Saudubray JM, Doin Éditeurs, 1991: 167-180.
- Rötig A, Bessis JL, Romero N, Cormier V, Saudubray JM, Narcy P, Lenoir G, Rustin P, Munnich A. Maternally inherited duplication of the mitochondrial genome in a syndrome of proximal tubulopathy, diabetes mellitus, and cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 1992;50(2):364-70.
- Rötig A, Lonlay P, Chétien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, Rustin P. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 1997 ; 17(2):215-17.

- Rowland LP, Hays AP, DiMauro S, et al. Diverse clinical disorders associated with morphological abnormalities of mitochondria. In G Scarlato, C Cerri (eds). *Mitochondrial Pathology in Muscle Diseases*. Padova: piccin, 1983;141.
- Rowland LP, Hirano M, DiMauro S, Schon EA. Oculopharyngeal muscular dystrophy, other ocular myopathies, and progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 1997;7 Suppl 1:S15-21.
- Ruitenbeek W, Seungers RCA, Wendel U, Trijbels JMF. Prenatal diagnosis in mitochondrial encephalomyopathies. Yes or no? *Enzyme Protein* 1994; 47: 174-175.
- Ruitenbeek W, Wendel U, et al: Mitochondrial energy metabolism. In *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*: Blau N, Duran M, Blaskovics ME: London, Chapman & Hall, 1996<sup>a</sup>; 391-406.
- Ruitenbeek W, Wendel U, Hamel BCJ: Genetic counselling and prenatal diagnosis in disorders of the mitochondrial energy metabolism. *J Inher Metab Dis* 1996<sup>b</sup>; 19: 581-587.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Wucher A, Saudubray JM, Rotig A, Munnich A. Assessment of the mitochondrial respiratory chain. *Lancet* 1991; 338(8758): 60.
- Rustin P, Lebidou J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF, Rotig A, Sidi D, Munnich A. The investigation of respiratory chain disorders in heart using endomyocardial biopsies. *J Inher Metab Dis* 1993; 16:541-544.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994; 228: 35-51.
- Rustin P et al. Dix ans d'exploration des maladies mitochondriales : une collaboration modèle entre chercheurs et cliniciens. *Médecine/sciences* 1996; 12, 37-43.
- Rustin P, Geromel D, Chrétien D, Munnich A, Rotig A. Mitochondrial enzymes targeted in Friedreich ataxia are protected from iron-induced injury by idebenone. *Am Society of Genetics*, 1998, Denver, USA, P-2330.
- Sambrook MA, Hutchinson EC, Aber GM. Metabolic studies in subarachnoid haemorrhage and strokes. I. Serial changes in acid-base values in blood and cerebrospinal fluid. *Brain* 1973;96(1):171-90.
- Sanchez-Casis, G. Cote, M & Barbeau, A, Pathology of the heart in Friedreich's ataxia review of the literature and report one of case. *Can J Neurol Sci* 1997; 3: 349-354.
- Santorelli FM, Shanske S., Macaya A., et al. The mutation at nt-8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome, *Ann Neurol* 1993; 34: 827-834.
- Santorelli FM, Shanske S, Jain K.D, Tick D, Schan EA, DiMauro S. A T→C mutation at nt-8993 of mitochondrial DNA in a child with Leigh syndrome. *Neurology* 1994; 44 (4) 972-974.
- Santorelli FM, Mak SC, Vasquez Memige E et al. Clinical heterogeneity associated with the mitochondrial DNA T8993C point mutation. *Pediatric Res*, 1996<sup>a</sup>; 39: 914-7.
- Santorelli FM, Mak SC, El-Schakawi M, Casali C, Shanske S, Baram TE, Madrid RE et al. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> gene (G8363A). *Am J Hum Genet* 1996<sup>b</sup>; 58: 933-939.
- Santorelli F, Barmada M, Pons R, et al. Leigh-type neuropathology in Pearson syndrome associated with impaired ATP production and a novel mtDNA deletion. *Neurology* 1996<sup>c</sup>; 37: 1320-1323.

- Santorelli FM, Sciacco M, Tanji K, Shanske S, Vu TH, Golzi V, Griggs RC, Mendell JR, Hays AP, Bertorini TE, Pestromk A, Bonilla E, DiMauro S. Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: a study of 56 patients. *Ann Neurol* 1996<sup>d</sup>; 39:789-795.
- Santorelli FM, Schlessel JS, Slonim AE, DiMauro S. Novel mutation in the mitochondrial DNA tRNA glycine gene associated with sudden unexpected death. *Pediatric Neurology* 1996<sup>e</sup>; 15:145-149.
- Santorelli FM, Hirano M, Shanske S, Tanji K, Bonilla E, Silvestri G, Cifaloni E, Tonin P, DiMauro S. clinical, biochemical, and genetic features of patients with multiple mtDNA deletions. *Neurology* 1997<sup>a</sup>; 48: A354.
- Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, Shanske S, Vilarinho L, Hays AP, DiMauro S. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997<sup>b</sup>; 238: 326-328.
- Saraste M. Location of haem-binding sites in the mitochondrial cytochrome b. *FEBS Lett* 1984; 166 (2): 367-372.
- Satoh M, Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res* 1991;196(1):137-40.
- Saudubray JM, Marsac C, Charpentier C, Cathelineau L, Besson-Léaud M, Leroux JP. Neonatal congenital lactic acidosis with pyruvate carboxylase deficiency in two siblings. *Acta Paediatr Scand* 1976; 65: 717-726.
- Saudubray JM, Ponsot J: Les maladies génétiques de la mitochondrie. *Arch Fr Pédiatr* , 1992; 49: 295-300.
- Saudubray JM, Charpentier C. Diagnostic algorithms and approach to diagnosis of hereditary metabolic disease. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*: Scriver CR, Beaudet al, Sly WS, Valle D, New York, MacGraw Hill, 7<sup>th</sup> Edition 1994; 327-400.
- Schmickel RD, Knoller M. Characterization and localization of the human genes for ribosomal ribonucleic acid. *Pediatr Res* 1977;11(8):929-35.
- Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, et al. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 1989; 244: 346.
- Schon EA, Tritschler HJ, Moraes CT, et al. Mitochondrial Myopathies. *Intern Pediatr* 1992; 7 (1): 23-27.
- Schon EA, et al. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenergetics and Biomembranes* 1997, 29 , 131-149.
- Schon EA. The mitochondrial genome. In: In: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL (eds), *The molecular and genetic basis of neurological disease* (2<sup>nd</sup> edition) Boston: Butterworth-Heinemann 1997 ; 189-200.
- Schuelke M, Smeitink J, Mariman E, Loeffen J, Plecko B, Trijbels F, Stockler-Ipsiroglu S, van den Heuvel L. Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 1999;21(3):260-1.
- Seibel P, Degoul F, Bonne G, et al. Genetic, biochemical and pathophysiological characterization of a familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF). *J Neurol Sci* 1991; 105: 217-224.
- Seibel P, Lauber J, Klopstock T, Marsac C, Kadenbach B, Reichmann H. Chronic progressive external ophthalmoplegia is associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Asn) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 28;204(2):482-9.

- Sengers RCA, Fischer JC, Tribels JMF, et al. A mitochondrial myopathy with a defective respiratory chain and carnitine deficiency. *Eur J Pediatr* 1983; 240: 332.
- Sengers RC, Stadhouders AM, Trijbels JM. Mitochondrial myopathies. Clinical, morphological and biochemical aspects. *Eur J Pediatr* 1984;141(4):192-207.
- Servidei S, Zeviani M, Manfredi G, et al: Dominantly inherited mitochondrial myopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA: clinical, morphological, and biochemical studies. *Neurology* 1991; 41: 1053-1059.
- Servidei S.: Mitochondrial Encephalomyopathies: Gene Mutation. *Neuromusc Disord*, 1999.
- Shanske S. Widespread tissue distribution of mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 1990; 40:24-28.
- Shanske AL, Shanske S, Silvestri G, Tanji K, Werthein D, Lipper S. MELAS point mutation with unusual clinical presentation. *Neuromusc. Disord.* 1993; 3(3): 191-193.
- Shanske S, DiMauro S: Mitochondrial Myopathies: Biochemical Aspects. *Current Topics in Bioenergetics* 1994;17: 21-58.
- Shapira AH, Harel S, Russel A. Mitochondrial encephalomyopathies: a group of neuromuscular disorders with defects in oxidative metabolism. *Isr J Med* 1977;1: 161.
- Shapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1410(2):159-170.
- Shields K ; Bridge P. 1999; MITOMAP mtDNA Sequence Data
- Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, et al. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with mitochondrial DNA deletion: a slip replication model and metabolic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7952.
- Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* 1990, 15; 61(6): 931-7.
- Shoffner JM, Fernhoff PM, Krawiecki NS, Caplan DB, Holt IJ, Koontz DA et al. Subacute necrotizing encephalopathy: oxidative phosphorylation defects and the ATPase 6 point mutation. *Neurology* 1992; 42:2168-2174.
- Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang CC, Gearing M, Salvo R, et al. Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 1993;17(1):171-84.
- Shoffner JM, Wallace DC: Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations: diagnosis and treatment. *Annu Rev Nutr* 1994; 14: 535-568.
- Shoffner JM, Bialer MG, Pavlakis SG, Lott M, Kaufman A, Dixon J, Teichberg S, Wallace DC. Mitochondrial encephalomyopathy associated with a single nucleotide pair deletion in the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene. *Neurology* 1995; 45(2): 286-92.
- Shoffner JM. Maternal inheritance and the evaluation of oxidative phosphorylation diseases. *Lancet* 1996;348(9037):1283-8.
- Shuelke M, Loeffen J, Mariman E, Smeitink J, van den Heuvel L. Cloning of the Human Mitochondrial 51 kDDA Subunit (NDUFV1) Reveals a 100% Antisense Homology of Its 3'UTR with the 5'URT of the  $\gamma$ -Interferon Inducible Protein (IP-30) Precursor: Is This a Link between Mitochondrial Myopathy and Inflammation? *Biochemical and Biophysical Research communications* 1998; 245: 599-606.

- Schuelke M, Smeitink J, Mariman E, Loeffen J, Plecko B, Trijbels F, Stockler-Ipsiroglu S, van den Heuvel L. Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 1999; 21(3):260-1.
- Shtilbans A, El-Schahawi M, Malkin E, Shanske S, Musumeci O, DiMauro S. A novel mutation in the mitochondrial DNA transfer ribonucleic acid Asp gene in a child with myoclonic epilepsy and psychomotor regression. *J Child Neurol* 1999;14(9):610-3.
- Shy GM, Gonatas NK. Human myopathy with giant abnormal mitochondria. *Science* 1945; 145:493.
- Shy GM. Effects on central nervous system, peripheral nerve, myoneural junction, and muscle by carcinoma remote from such organs. *Proc Natl Cancer Conf* 1964;5:421-7.
- Shy GM, Gonatas NK, Perez M. Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoclonial myopathy. *Brain* 1966; 89: 133.
- Silvestri G, Moraes CT, Shanske S, Oh SJ, DiMauro S. A new mtDNA mutation in the tRNA(Lys) gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 1992;51(6):1213-7.
- Silvestri G, Ciafaloni E, Santorelli FM, Shanske S, Servidei S, Graf WD, Sumi M, DiMauro S. Clinical features associated with the A→G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology* 1993; 43: 1200-1206.
- Silvestri G, Santorelli FM, Shanske S, et al. A New mtDNA Mutation in the tRNA Leu (UUR) gene associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mut* 1994; 3: 37-43.
- Silvestri G, Rana M, DiMuzio A, Uncini A, Tonali P, Servidei S. A late-onset mitochondrial myopathy is associated with a novel mitochondrial DNA (mtDNA) point mutation in the tRNA(Trp) gene. *Neuromuscul Disord* 1998;8(5):291-5.
- Skehel JM, Fearnley IM, Walker JE. NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria: sequence of a novel 17.2-kDa subunit. *FEBS Lett* 1998;438(3):301-5.
- Slipetz DM, Aprille JR, Goodyer PR, Rozen R. Deficiency of complex III of the mitochondrial respiratory chain in a patient with facioscapulohumeral disease. *Am J Hum Genet* 1991;48(3):502-10.
- Smeitink J, Loeffen J, Smeets R, Triepels R, Ruitenbeek W, Trijbels F, van den Heunen L. molecular characterization and mutational analysis in the human B17 subunit of the mitochondrial respiratory chain complex I. *Hum Genet* 1998; 103:245-250.
- Smeitink J, van den Heuvel L. Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1505-1510.
- Sparaco M, Bonilla E, DiMauro S, Powers J. Neuropathology of mitochondrial encephalomyopathies due to mitochondrial DNA defects. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52(1): 1-10.
- Sperl W, Ruitenbeek W, Trijbels JMF. Mitochondrial myopathy with lactic acidemia, Fanconi-de Toni-Debre syndrome and a disturbed succinate: cytochrome c oxidoreductase activity. *Euro J Pediatr* 1988; 147: 418.
- Sperl W. Cardiomyopathy and mitochondrial defects of oxidative energy metabolism. In: Böhles H, Hofstetter R, Sewell AC, eds. *Metabolic Cardiomyopathy*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 1995: 99-114.
- Stansbie D, Sherriff RJ, Denton RM. Fructose load test--an in vivo screening test designed to assess pyruvate dehydrogenase activity and interconversion. *J Inherit Metab Dis* 1978; 1(4): 163-5.

- Sternberg D, Danan C, Lombes A, Laforet P, Girodon E, Goossens M, Amselem S. Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet* 1998;7(1):33-42.
- Suomalainen A, Majander A, Haltia M, et al. Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Investigation* 1992; 90: 61.
- Suomalainen A, Kaukonen J, Amati P, Timonen R, Haltia M, Weissenbach J, Zeviani M, Somer H, Peltonen L. An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1995; 9(2):146-51.
- Sue CM, Hirano M, DiMauro S, and De Vivo DC. Neonatal presentations of mitochondrial metabolic disorders. *Seminars in Perinatology* 199; 23: 113-114.
- Suzuki H, Ozawa T. An ubiquinone-binding protein in mitochondrial NADH-ubiquinone reductase (Complex I). *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138(3):1237-42.
- Sweeney MG, Brockington M, Weston MJ, Morgan-Hughes JA, Harding AE. Mitochondrial DNA transfer RNA mutation Leu(UUR)A-->G 3260: a second family with myopathy and cardiomyopathy. *Q J Med* 1993 Jul; 86(7): 435-8.
- Szabolcs MJ, Seigle R, Shanske S, et al. Mitochondrial DNA deletion: A cause of chronic tubulointerstitial nephropathy. *Kidney Int* 1994; 45: 1388.
- Takanashi J, Sugita K, Tanabe Y, Maemoto T, Niimi H. Dichloroacetate treatment in Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA mutation. *J Neurol Sci* 1997;145(1):83-6.
- Takei Y, Ikeda S, Yanagisawa N, Takahashi W, Sekiguchi M, Hayashi T. Multiple mitochondrial DNA deletions in a patient with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy but not ophthalmoplegia. *Muscle Nerve* 1995, 18:1321-1325.
- Tanaka M, Sato W, Ohno K, et al. Direct sequencing of deleted mitochondrial DNA in myopathic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 156.
- Tanaka M, Ozawa T. Strand asymmetry in human mitochondrial DNA mutations. *Genomics* 1994;22(2):327-35.
- Tanno Y, Yoneda M, Nonaka I, Tanaka K, Miyakate T, Tsuji S. Quantitation of mitochondrial DNA carrying tRNA lys mutation in MERRF patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 880-885.
- Tatuch Y, Robinson B. Leigh's disease due to heteroplasmic mt DNA mutation at 8993 within the ATPase 6 gene. *SSIEM Annual Meeting*, 1991, P-106.
- Tatuch Y, Christodoulou, Feigenbaum A, Clarke JTR, Wherret J, Smith C, Rudd N, Robinson BH. Heteroplasmic mtDNA mtDNA mutation (T→G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet* 1992; 50:852-858.
- Tatuch Y and Robinson BH. The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondrial. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 192: 124-128.
- Taylor DJ, Kemp GJ, Radda GK. Bioenergetics of skeletal muscle in mitochondrial myopathy. *J Neurol Sci* 1994;127:128.
- Taylor RW, Chinnery PF, Bates MJ, Jackson MJ, Johnson MA, Andrews RM, Turnbull DM. A novel mitochondrial DNA point mutation in the tRNA(Ile) gene: studies in a patient presenting with chronic progressive external ophthalmoplegia and multiple sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;243(1):47-51.

- Tengan CH, Moraes CT. Detection and analysis of mitochondrial DNA deletions by whole genome PCR. *Biochem Mol Med* 1996; 58, 130-134.
- Thyagarajan D, Shanske S, Vasquez-Memije ME, et al. A novel mitochondrial ATPase 6 point mutation in familial bilateral striatal necrosis. *Ann Neurol* 1995; 38: 418.
- Tiranti V, Chariot P, Carella F et al. Maternally inherited hearing loss and myoclonus associated with a novel point mutation in mitochondrial tRNA<sup>Ser (UCN)</sup> GENE. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1421.
- Tiranti V, Hoernagel K, Carozzo R, Galimberti C, Murano M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez J-A, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T, Zeviani M. Mutations of SURF-1 in Leigh Disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1609-1621.
- Tiranti V, Jaksch M, Hofmann S, Galimberti C, Hoernagel K, Iulli L, Freisinger P, Bindoff L, Gerbitz KD, Comi GP, Uziel G, Zeviani M, Meitinger T. loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Ann Neurol* 1999; 46:161-166.
- Tome FM, Fardeau M. Nuclear changes in muscle disorders. *Methods Achiev Exp Pathol* 1986;12:261-96.
- Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JLCM, Buskens CAF, Smeets RJP, Rubio Gozalbo ME, Buddle SMS, et al. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol* 1999; 45: 787-790.
- Tritschler HJ, Andretta F, Moraes CT, Bonilla E, Arnaudo E, Danon MJ et al. Mitochondrial myopathy of childhood associated with depletion of mtDNA. *Neurology* 1992; 42:209-217.
- Tritschler HJ, Medori R Mitochondrial DNA alterations as a source of human disorders. *Neurology* 1993; 43(2):280-8.
- Trumpower BL. New concepts on the role of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain. *J Bioenerg Biomembr* 1981; 13: 1.
- Tyler D. The structure of mitochondria. In : *The mitochondrion in health and disease*. VCH Publishers, USA, 1992: 41-93.
- Uziel G, Moroni I, Lamantea E, Fratta GM, Ciceri E, Carrara F, Zeviani M. Mitochondrial disease associated with the T8993G mutation of the mitochondrial ATPase 6 gene: a clinical, biochemical, and molecular study in six families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997 Jul;63(1):16-22.
- van den Heuvel L, Ruitenbeek W, Smeets R, Gelman-Kohan Z, Elpeleg O, Loeffen J, Trijbels F, et al. Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet* 1998; 62:262-268.
- van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1992;1(5):368-71.
- Vazquez-Memije ME, Shanske S, Santorelli FM, et al. Comparative biochemical studies in cells from patients with mutations in ATPase 6 gene of mitochondrial DNA. *Neurology* 1995; 45 (Suppl4): A402.

- Vazquez-Memije ME, Shanske S, Santorelli FM et al. Comparative biochemical studies in fibroblasts from patients with different forms of Leigh syndrome. *J Inher Met Dis* 1996; 19:43-50.
- Vazquez-Memije ME, Beltran C, Tuena de Gomez-Puyou M. Isolation and comparative studies of mitochondrial F1-ATPase from rat testis and beef heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997;116(3):303-9.
- Vazquez-Memije ME, Shanske S, Santorelli FM, et al. Comparative biochemical studies of ATPases in cells from patients with the T8993G or T8993C mitochondrial DNA mutation. *J Inher Metab Dis* 1998;(8):829-836.
- Vilarinho L, Cardoso ML, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das citopatias mitocondriais: Parte I. *Arquivos de Medicina* 1997<sup>a</sup>; 11(2): 75-81.
- Vilarinho L, Cardoso ML, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das citopatias mitocondriais: Parte II - Revisão de 30 doentes. *Arquivos de Medicina* 1997<sup>b</sup>; 11(3): 160-166.
- Vilarinho L, Maia C, Coelho T, Coutinho P, Santorelli FM. Heterogeneous presentation in Leigh syndrome. *J. Inher. Metab. Dis.* 1997<sup>c</sup>; 20: 704-705.
- Vilarinho L, Santorelli FM, Rosas MJ, Tavares C, Melo-Pires M, DiMauro S. The mitochondrial A3243G mutation presenting as severe cardiomyopathy. *J. Med. Gent.* 1997<sup>d</sup>; 34(7): 607-609.
- Vilarinho L., Santorelli F.M., Cardoso M.L., Coelho T., Guimarães A., Coutinho P. Mitochondrial DNA Analysis in Ocular Myopathy: Observations in 29 Portuguese Patients. *Eur. Neurol* 1998, 39, 148-153.
- Vilarinho L, Rodrigues L, Coelho I, Rocha H, Melo Pires M, Guimarães A Heterogeneidade clínica de 6 casos com a mutação "MELAS" A3243G do DNA mitocondrial. *Acta Pediatr Port* 1999<sup>a</sup>; 2 (30): 149-155.
- Vilarinho L, Santorelli FM, Coelho I, Rodrigues L, Maia M, Barata I, Cabral P, Dionísio A, Guimarães A, DiMauro S. The mitochondrial DNA A3243G mutation in Portugal: clinical and molecular studies in 5 families. *J Neurol Sci* 1999<sup>b</sup>; 163: 168-174.
- Vilarinho L, Leão E, Barbot C, Santos M, Rocha H, Santorelli FM. Clinical and molecular studies in three Portuguese mtDNA T8939G families *Pediatr Neurol* 2000; 22: 29-32.
- Villani G, Attardi G. In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(4):1166-71.
- Vissing J, Salamon MB, Arlien-Soborg P, Norby S, Manta P, DiMauro S, Schmalbruch H. A new mitochondrial tRNA(Met) gene mutation in a patient with dystrophic muscle and exercise intolerance. *Neurology* 1998;50(6):1875-8.
- Vu TH, Sciacco M, Tanji K, et al. Clinical manifestations of mitochondrial DNA depletion. *Neurology* 1988; 50:1783-1790.
- Wallace DC. Structure and evolution of organelle genomes. *Microb Rev.* 1982; (2):208-240.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988<sup>a</sup>; 242: 1427-1430.
- Wallace DC, Zheng X, Lott MT, et al. Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetics, pathophysiological and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 1988<sup>b</sup>; 55: 601-610.

- Wallace DC, Lott M. T., Shoffner J.M., Diseases Resulting from Mitochondrial DNA Point Mutations, *J Inher Metab Dis* 1992, 15 : 54-61.
- Wallace DC. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 1175-1212.
- Wallace DC, Shoffner JM, Brown MD, et al. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*.1995; 1271(1):141-151.
- Walker JE. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys* 1992;25(3):253-324.
- Weber K, Wilson JN, Taylor L, Brierley E, Johnson MA, Turnbull DM, Bindoff LA. A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1997;60(2):373-80.
- Weiss H, Linke P, Haiker H, Leonard K. Structure and function of the mitochondrial ubiquinol: cytochrome c reductase and NADH: ubiquinone reductase. *Biochem Soc Trans* 1987; 15: 100-102.
- White SL, Shanske S, Biros I, Warwick L, Dahl HM, Thorsum DR, DiMauro S. Two cases of prenatal analyses for the pathogenic T→G substitution at nucleotide 8993 in mitochondrial DNA. *Prenat Diagn* 1999; 19: 1165-1168.
- Wikstrom M, Krab K, Saraste M. Proton-translocating cytochrome complexes. *Ann Rev Biochem* 1981; 50: 623-655.
- Wikstrom M. Two protons are pumped from the mitochondrial matrix per electron transferred between NADH and ubiquinone. *FEBS Lett* 1984;169(2):300-4.
- Wikstrom M, Krab K. The semiquinone cycle. A hypothesis of electron transfer and proton translocation in cytochrome bc-type complexes. *J Bioenerg Biomembr* 1986; 18: 181-193.
- Willems JL, Monnens LA, trijbels JM, Veerkamp JH, Meyer AE, van Dam K, van Haelst U. Leigh encephalomyelopathy in a patient with cytochrome c oxidase deficiency in muscle tissue. *Pediatrics* 1977; 60:850-857.
- Wong LJ, Senadheera D. Direct detection of multiple point mutations in mitochondrial DNA. *Clin Chem* 1997; 43(10): 1857-61.
- Yaneda M, Miyatake T, Attardi G. Heteroplasmic mitochondrial tRNA(Lys) mutation and its complementation in MERRF patient-derived mitochondrial transformants. *Muscle Nerve* 1995 ; 3 : 595-101.
- Yoon KL, Ernst SG, Rasmussen C, Dooling EC, Aprille JR. Mitochondrial disorder associated with newborn cardiopulmonary arrest. *Pediatr Res* 1993;33(5):433-40.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, et al. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns –Sayre syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346.
- Zeviani M, Servidei S, Gellera C, et al. An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 1989; 339-309.
- Zeviani M, Gellera C, Pannaci M, et al. Tissue distribution and transmission of mitochondrial DNA deletions in mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 1990<sup>a</sup>; 28: 94.
- Zeviani M, Bresolin N, Gellera C, Bordoni A, et al. Nucleus-driven multiple large-scale deletions of the human mitochondrial genome: A new autosomal dominant disease. *Am J Hum Genet* 1990<sup>b</sup>; 47: 904-914.
- Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, Rimoldi M, Morandi L, Villani F, Tiranti V, DiDonato S. Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. *Lancet* 1991 20; 338(8760) : 143-7.

- Zeviani M, and Tiranti V: Inherited Mendelian Defects . In: Mitochondrial DNA in Human Pathology : DiMauro S, and Wallace DC, New York, Raven Press Ltd 1993; 85-95.
- Zeviani M, Muntuoni F, Savarese N, Serra G, Tiranti V, Carrara F, Marioti C, DiDonato S. A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA<sup>Lys</sup> gen. Eur J Hum Genet 1993; 1: 80-87.
- Zeviani M, Bertagnolio B, and Uziel G: Neurological presentations of mitochondrial diseases. J Inher Metab Dis 1996; 19: 504-520.
- Zeviani M, Petruzzella V, Carrozo R: Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signalling. J Bioenerg Biomembr 1997; 29:121-130.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. Neurology 1998;51(6):1525-1533.
- Zheng XX, Shoffner JM, Voljavec AS, Wallace DC. Evaluation of procedures for assaying oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myopathy muscle biopsies. Biochim Biophys Acta 1990; 1019(1): 1-10.
- Zhu Z, Yao J, Johns T, et al. SURF-1 encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome oxidase, is mutated in Leigh syndrome. Nat Genet 1998; 20: 337-343.

**Parte V**

---

**Resumos**

## Resumo

As doenças mitocondriais constituem um grupo heterogéneo de doenças que se caracterizam por alterações da estrutura mitocondrial e deficiência da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Nos últimos anos foram identificadas no DNA mitocondrial (mtDNA) numerosas mutações associadas a síndromes clínicas, a maioria dos quais envolvendo o músculo esquelético e o cérebro. Contudo, como as mitocôndrias são organelos ubiquitários, os défices da OXPHOS podem afectar qualquer órgão ou tecido do organismo, o que conduz ao conceito alargado de citopatias mitocondriais (CM).

De início, o diagnóstico das CM era feito com base nos dados clínicos e na identificação de anomalias nas biópsias musculares. Mais tarde, estudos bioquímicos sistemáticos permitiram a caracterização de défices isolados ou combinados dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Rapidamente se constatou, no entanto, que nem os dados morfológicos nem os bioquímicos isoladamente permitiam uma classificação sistemática das CM. Os progressos na genética molecular vieram dar um melhor conhecimento das suas bases genéticas, disponibilizando novos meios de diagnóstico e formas de classificação.

O objectivo do nosso trabalho foi iniciar os estudos bioquímicos da actividade da OXPHOS em Portugal e disponibilizar a investigação molecular do mtDNA nas CM.

A primeira parte do trabalho consistiu numa abordagem multidisciplinar de 435 doentes portugueses com apresentação clínica ou dados laboratoriais sugestivos de patologia mitocondrial. Destes doentes, 102 (com idades compreendidas entre 1,5 meses e 74 anos) tinham evidência clínica, morfológica e/ou bioquímica de CM.

Na segunda parte do estudo é abordada a estratégia utilizada na investigação molecular. Em 50 dos 102 doentes foi possível caracterizar as mutações responsáveis, abrangendo 11 alterações patogénicas diferentes. O espectro mutacional do mtDNA revelou deleções simples de grandes dimensões em 27 casos, depleção do mtDNA num, deleções múltiplas em seis e mutações pontuais em 16 casos: mutação A3243G em seis, A8344G em dois, T8993G/C em cinco e G11778A em três. Este estudo permitiu ainda a identificação de 27 polimorfismos em diferentes genes do mtDNA, dos quais 8 não estavam descritos.

A heterogeneidade clínica, patológica, bioquímica e molecular encontrada nos nossos doentes, veio sublinhar o problema da variabilidade da expressão fenotípica associada a cada mutação do mtDNA.

Com este estudo concluímos que: i) a apresentação clínica do grupo das encefalopatias é variável e não corresponde à de nenhum grupo sindrômico previamente descrito; ii) não é possível prever o défice enzimático nem a alteração genética do mtDNA com base exclusivamente na apresentação clínica; iii) os estudos enzimáticos confirmam o diagnóstico em doentes que apresentam estudos miopatológicos normais; iv) as mutações patogénicas do mtDNA são comuns e causam morbilidade crónica significativa; v) os estudos genéticos são úteis para distinguir os casos esporádicos dos de transmissão materna, o que permite a realização de um aconselhamento genético adequado.

Este estudo, o primeiro efectuado em doentes portugueses, confirma os dados já publicados enfatizando a utilidade da caracterização molecular num diagnóstico de certeza e levando a um melhor conhecimento destas doenças, não tão raras como inicialmente se supunha.

De futuro, iremos proceder à sequenciação completa do mtDNA em todos os doentes em que não foi ainda possível efectuar uma caracterização molecular e também alguns estudos do genoma nuclear nos casos com deficiência da OXPHOS em que o estudo do mtDNA não revelou mutações. Além disso, o desenvolvimento de modelos celulares relativamente simples tornará possível detectar quais as necessidades metabólicas exactas das células com disfunção da OXPHOS e testar diferentes condições de cultura ou de tratamento tanto em células mutadas como nas normais. Estes estudos poderão fornecer informações importantes sobre estas doenças, frequentemente fatais. Permitirão ainda desenvolver estratégias para a destruição ou inibição da replicação de determinados tipos de DNA.

## Summary

Mitochondrial diseases are a heterogeneous group of metabolic disorders characterized by abnormalities of the mitochondrial ultrastructure and impaired oxidative phosphorylation (OXPHOS). In the past years, the study of mitochondrial DNA (mtDNA) showed in a number of cases specific mutations associated with clinical syndromes mostly affecting skeletal muscle and brain. However, since mitochondria are ubiquitous, OXPHOS defects might affect any organ or tissue in the body. This leads to a broader concept of mitochondrial cytopathies (MC).

Initially, the diagnosis was based on clinical features and on the presence of abnormalities in the muscle biopsy specimens. Later, systematic biochemical studies led to the identification of single or multiple defects in the mitochondrial respiratory chain complexes. It soon became evident that neither morphological nor biochemical data alone could provide a systematic classification of MC. Advances in molecular genetics have increased our understanding of the genetic bases of these diseases, providing new tools for classification and diagnosis.

The aim of this work was to analyse OXPHOS activity in Portuguese patients and set up the molecular study for mtDNA abnormalities.

The first part of the project aimed at a multidisciplinary approach in 435 Portuguese patients who had clinical presentations or laboratory features suggestive of mtDNA-associated disorders. Among these patients, 102 (48 women and 54 men, age range 1.5 mo-74 yrs) showed clinical, morphological and/or biochemical evidence of MC. The group of patients proved to be representative of this type of pathology because it was composed by 49 children and 53 adults with a wide range of clinical and biochemical phenotypes.

The second part of the work dealt with the strategy of the molecular investigation. Out of 102 patients with MC, we characterized the disease causing mutations in 50 individuals with 11 different pathogenic changes. The mutational spectrum of the population under study revealed single large-scale mtDNA deletions in 27 patients, depletion in one and multiple deletions in 6 patients. MtDNA point mutations were found in 16 patients: the A3243G mutation in six, the A8344G in two, the T8993G/C in five, and G11778A in three. This study also allowed the detection of 26 polymorphisms in different genes of mtDNA, 8 of which are new.

As a whole, the clinical, pathological, biochemical and molecular heterogeneity in our patients underline the problem of the variability of the phenotypic expression associated with mtDNA mutations. We conclude that: i) the clinical presentation is quite variable and does not correspond to any former syndrome classification; ii) results from enzymatic and genetic analyses are not predictable on the sole basis of clinical presentation; iii) enzyme studies may confirm the diagnosis in the patients despite normal pathological studies; iv) pathogenetic mtDNA mutations are common and cause significant chronic morbidity; v) genetics studies are useful to differentiate sporadic from maternal-inherited cases, allowing a better genetic counselling.

This study, the first in Portuguese patients, confirms published data and emphasises the usefulness of genetic testing to reach a correct diagnosis. In future years, our research will go a step further in patients without molecular characterization. We will sequence the entire mtDNA. Further research for genetic defects in the nuclear genome will be also undertaken in OXPHOS-deficient patients negative for mtDNA mutations. The development of relatively simple cellular models will make possible to address the exact metabolic requirements for cells with OXPHOS impairment and to test different growth conditions or treatments in both mutated and wild type genomes. Such studies may provide useful insights as for the pathogenesis of these disorders, and will allow to devise possible strategies to impair or inhibit one type of DNA in its replication.

## Résumé

Les maladies mitochondriales sont un groupe hétérogène de maladies métaboliques caractérisées par des anomalies ultrastructurelles des mitochondries et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Récemment, l'étude de l'ADN mitochondrial (ADNmt) a permis l'identification d'un nombre considérable de mutations spécifiques associées à des syndromes cliniques avec atteinte préférentielle du cerveau et du muscle strié. Étant donné que les mitochondries sont ubiquitaires, les défauts OXPHOS peuvent, cependant, affecter n'importe quel organe ou tissu, ce qui élargi le concept de cytopathie mitochondriale (CM).

Le diagnostic était au départ basé sur les manifestations cliniques et la présence d'anomalies de la biopsie musculaire. L'étude biochimique a permis plus tard l'identification de défauts uniques ou multiples des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Aucun de ces défauts ne peut cependant aboutir à une classification des CM. Le progrès de la génétique moléculaire a donné une contribution majeure pour la compréhension des bases génétiques de ces maladies.

L'objectif de notre travail a été l'analyse biochimique et moléculaire de 102 malades portugais (âgés de 1,5 mois à 74 ans) avec évidence morphologique et/ou biochimique de CM, couvrant un grand spectre de phénotypes cliniques et biochimiques.

Nous avons caractérisé les mutations responsables (11 altérations pathogéniques différentes) chez 50 malades, un grand nombre de délétions du ADNmt chez 27 malades, des délétions multiples chez 6 malades et un cas de déplétion. Des mutations ponctuelles du ADNmt ont été identifiées chez 16 malades. Cette étude a aussi permis la détection de 26 polymorphismes en gènes différents du ADNmt, dont 8 nouveaux.

À l'hétérogénéité pathologique, biochimique et moléculaire correspond la variabilité phénotypique associée aux mutations du ADNmt. Nous concluons que: i) la présentation clinique est très variable et ne correspond à aucune classification syndromatique antérieure; ii) les résultats de l'analyse enzymatique et génétique ne sont pas prévisibles d'après la présentation clinique; iii) l'étude enzymatique confirme le diagnostic malgré une étude pathologique normale; iv) les mutations pathologiques du ADNmt sont fréquentes et responsables par une morbidité chronique significative; v)

l'étude génétique est utile pour le diagnostic différentiel entre les cas sporadiques et ceux hérités par voie maternelle, permettant un conseil génétique plus précis.

Cette étude, effectuée pour la première fois au Portugal, confirme les résultats de travaux antérieurs et la contribution de l'analyse moléculaire à un diagnostic précis. Notre intention est de l'étendre dans l'avenir au génome nucléaire chez les malades avec déficit de l'OXPPOS dont l'étude de l'ADNmt n'a pas mis en évidence des mutations. Le développement de modèles cellulaires relativement simples permettra aussi d'évaluer les nécessités métaboliques exactes des cellules avec des déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale et de tester différentes conditions de culture ou de traitement des cellules normales et mutées. Ces études pourront donner des renseignements importants sur ces maladies et permettront d'établir les stratégies visant la destruction ou l'inhibition spécifiques de la réplication de différents types d'ADN.

**Parte VI**

---

**Anexos**

## Agradecimentos

Só apenas ao concluir este trabalho foi possível aperceber-me, globalmente, do somatório de esforços, generosidade e boas vontades que contribuíram para a sua realização. Pessoas de diversas profissões e diferentes qualificações tornaram possível a sua concretização, quer através da sua contribuição directa, quer indirectamente pela amizade, apoio e incentivo. Para além de um dever é com gosto que desejo agradecer a todos os que me honraram com a sua colaboração. Gostaria, no entanto, de referir alguns daqueles que foram os nossos pilares e suporte da obra.

Ao Dr António Guimarães pela responsabilidade que tem de ser o principal impulsionador deste trabalho, pela sua vigilância e meticulosa colaboração e, sobretudo, pela sua amizade.

To Professor Salvatore DiMauro, from Columbia University, N.Y., a special word to express my gratefulness for the unvaluable knowledges transmitted along these years of fruitful collaboration, the critical suggestions formuladed and, yet, for the encouragment always expressed.

À Doutora Paula Coutinho agradeço todos os conhecimentos que sempre soube transmitir-me de uma forma clara e precisa e a leitura atenta e cuidada que fez desta dissertação. Agradeço ainda todo o estímulo, apoio e disponibilidade evidenciados.

À Professora Maria João Saraiva, a gratidão sincera pela dádiva da sua amizade, ensinamentos, confiança, entusiasmo, críticas, sugestões e estímulo permanente.

Ao Dr Rui Vaz Osório, sob cuja direcção iniciei a minha formação de genética laboratorial, o meu reconhecimento sincero. O seu empenho, tenacidade e espírito de luta contra a adversidade constituem um exemplo, que marcam definitivamente todos quantos têm o privilégio de com ele privar.

Ao Dr Filippo Santorelli desejo exprimir o meu reconhecimento pela inestimável ajuda e colaboração que em muito contribuíram para o meu entusiasmo e dedicação a esta área do conhecimento. Muito admirei o seu rigor e capacidade de trabalho

À le Docteur Bénédicte Mousson je remercie de tout cœur pour la collaboration donné au début de cette étude.

Uma palavra muito especial de reconhecimento para a minha colega e amiga Maria Luís Cardoso pela sua amizade, incondicional apoio e estímulo permanente. A sua generosidade e disponibilidade que sempre me dispensou nos momentos difíceis foram fundamentais para acabar este trabalho.

Ao Dr Hugo Rocha e à Dra Dulce Quelhas, pela sua criatividade e pela paciente simpatia na composição gráfica da capa e formatação global do texto.

Ao Professor António Amorim, o meu reconhecido agradecimento pelo seu interesse e revisão crítica do texto

À Dra Manuela Almeida, a sua eterna disponibilidade, estímulo e sobretudo pela sua amizade.

A todos os Amigos e Colegas do Instituto de Genética Médica e em especial aos da Unidade de Biologia Clínica a minha sincera gratidão. Uma palavra de particular apreço às técnicas Célia Nogueira e Cristina Pereira pela dedicação e interesse com que sempre colaboraram nesta obra, tendo contribuído com incontáveis horas de labor pessoal e trabalho assistencial suplementar.

À equipa do Dr António Guimarães agradeço a contribuição prestada ao proporcionar o rápido e eficiente acesso às biópsias musculares.

Aos médicos que ao longo dos anos, colaboraram de forma tão entusiasta neste estudo: Dra. Clara Barbot, Dra Teresa Coelho, Dra Manuela Santos, Dra Elisa Leão, Dr Pedro Cabral, Dra Isabel Coelho, Dra Esmeralda Martins, Dr Dílio Alves, Dr Rui Chorão; Dr José Barros, Dr Aguiinaldo Cabral, Dra Maria José Rosas e a muitos outros cuja omissão injusta desde já me penitencio. À Professora Carolina Silva o meu muito obrigado pela sua grande disponibilidade.

À Paula Machado, o meu sincero agradecimento pela sua permanente disponibilidade e apoio logístico.

À Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento (FLAD), agradeço o apoio e a confiança que demonstrou nesta investigação através da concessão de bolsas, que financiaram as minhas deslocações e estadias nos EUA.

*"This is not the end.*

*This is not even the beginning of the end.*

*But it is perhaps the end of the beginning".*

*Winston Churchill, 1942*

## Abreviaturas

<b>A</b>	- Adenina
<b>Ac.</b>	- Anticorpo
<b>Alt.</b>	- Alterações
<b>ADP</b>	- Adenosina -5'-difosfato
<b>ATP</b>	- Adenosina -5'-trifosfato
<b>C</b>	- Citosina
<b>CM</b>	- Citopatia mitocondrial
<b>CoA</b>	- Coenzima A
<b>CoQ</b>	- Coenzima Q
<b>COX</b>	- Citocromo <i>c</i> oxidase
<b>COX (-)</b>	- Fibras citocromo <i>c</i> oxidase negativas
<b>CRM</b>	- Cadeia respiratória mitocondrial
<b>CK</b>	- Creatina fosfoquinase
<b>CS</b>	- Citrato sintetase
<b>Dx</b>	- Doente n°
<b>Da</b>	- Daltons
<b><math>M\Delta</math>mtDNA</b>	- Deleções múltiplas
<b>DCRM</b>	- Disfunções da cadeia respiratória mitocondrial
<b>Cit</b>	- Citocromo
<b>ddATP</b>	- 2',3'-dideoxiadenosina-5'-trifosfato
<b>ddCTP</b>	- 2',3'-dideoxicitidina-5'-trifosfato
<b>ddGTP</b>	- 2',3'-dideoxiguanosina-5'-trifosfato
<b>ddNTPs</b>	- Dideoxinucleosídeos-5'-trifosfato
<b>ddTTP</b>	- 2',3'-dideoximidina-5'-trifosfato
<b>déf.</b>	- Défice/deficiência
<b>del</b>	- Delecção
<b>dNTPs</b>	- Deoxinucleosídeos-5'-trifosfato
<b>ECG</b>	- Ecocardiograma, electrocardiograma
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EEG</b>	- Electroencefalograma
<b>EMG</b>	- Electromiograma
<b>G</b>	- Guanina
<b>HMP</b>	- Hospital Maria Pia
<b>HGSA</b>	- Hospital Geral de Santo António
<b>Kb</b>	- Kilobases
<b>KSS</b>	- Síndrome de Kearns-Sayre ( <i>Kearns-Sayre CMdrome</i> )
<b>LCR</b>	- Líquido cefalorraquidiano
<b>L/P</b>	- Razão lactato/piruvato
<b>M</b>	- Marcador de peso molecular conhecido
<b>M.E.</b>	- Microscopia electrónica
<b>MELAS</b>	- Síndrome caracterizada por encefalopatia mitocondrial, com acidose láctica e acidentes vasculares ( <i>Mitochondrial encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes</i> )
<b>MERRF</b>	- Síndrome caracterizada por epilepsia mioclónica com fibras rotas e vermelhas ( <i>Myoclonus epilepsy with ragged red fibers</i> )
<b>Met</b>	- Metionina
<b>min.</b>	- Minutos
<b>mtDNA</b>	- DNA mitocondrial
<b>mRNA</b>	- RNA mensageiro
<b>NAD</b>	- Dinucleotídeo de adenina e $\alpha$ -nicotinamida
<b>NADH</b>	- Forma reduzida do dinucleotídeo de adenina e $\alpha$ -nicotinamida

<b>NDNA</b>	- DNA nuclear
<b>nt</b>	- Nucleótido
<b>OXPHOS</b>	- Fosforilação oxidativa
<b>pb</b>	- Pares de bases
<b>PC</b>	- Piruvato carboxilase
<b>PCR</b>	- Reacção em cadeia da polimerase
<b>PDH</b>	- Piruvato desidrogenase
<b>PEO</b>	- Oftalmoplegia externa progressiva
<b>Pi</b>	- Fósforo inorgânico
<b>PM</b>	- Peso molecular
<b>Primers</b>	- Cadeias oligonucleotídicas de iniciação
<b>Q<sub>10</sub></b>	- Ubiquinona
<b>QI</b>	- Coeficiente intelectual
<b>RFLP</b>	- Polimorfismo nas dimensões dos fragmentos de restrição
<b>RMN</b>	- Ressonância magnética nuclear
<b>rpm</b>	- Rotações por minuto
<b>RRF</b>	- Fibra rota e vermelha (ragged-red fiber)
<b>rRNA</b>	- RNA ribossômico
<b>s</b>	- Segundos
<b>SDH</b>	- Succinato desidrogenase
<b>SL</b>	- Síndrome de Leigh
<b>SN</b>	- Sistema nervoso
<b>SNC</b>	- Sistema nervoso central
<b>SSCA</b>	- Análise conformacional do DNA em cadeias simples
<b>T</b>	- Timina
<b>TAC</b>	- Tomografia axial computadorizada
<b>TAE</b>	- Tampão tris-acetato-EDTA
<b>TP</b>	- Timidina fosforilase
<b>tRNA</b>	- RNA de transferência
<b>U</b>	- Unidades

## Anexo I – Técnicas enzimáticas para estudo da CRM.

Todos os métodos descritos podem ser utilizados quer em amostras de adultos quer de crianças. As actividades dos complexos da CRM são medidas por espectrofotometria em condições de velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e a pH óptimo das reacções.

O equipamento utilizado nestas determinações foi um espectrofotómetro *Shimazu* de duplo feixe - UV-160A com um CPS 240A; tendo sido utilizadas cuvets semi-micro descartáveis. Os reagentes são das marcas *Sigma* e *Merck* e a preparação laboratorial de algumas soluções é extemporânea de modo a evitar cinéticas degradativas e inquinações.

### Preparação da amostra

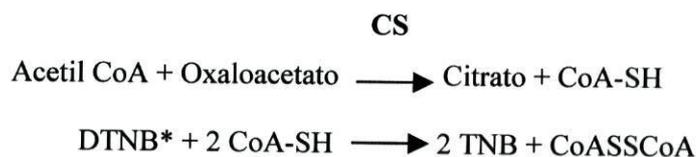
Cerca de 30mg de músculo esquelético congelado são triturados num homogeneizador de vidro em banho de gelo com tampão fosfato ( $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ ) 0,1M pH 7,4 na proporção de 1/15 (p/v) e centrifugado 10 minutos a 10.000 rpm. Na fracção enriquecida de mitocôndrias foram determinadas as actividades de cinco actividades enzimáticas relativas aos quatro complexos da CRM.

Os complexos podem ser inibidos por certas substâncias como a rotenona, o amobarbital, a piericidina A (complexo I), o malonato (complexo II) a antimicina A (complexo III) ou o cianeto (complexo IV) em locais específicos da cadeia respiratória.

### A) Determinação da citrato sintetase (CS)

A citrato sintetase (CS) é a primeira actividade a ser determinada no estudo enzimático da CRM. Em função desta actividade são ajustados as quantidades de amostra que se irão utilizar no estudo dos diferentes complexos.

#### I - Princípio do método utilizado



\* DTNB - ácido 5,5-ditio-bis [ 2-nitro-benzóico]; TNB - ácido 5-tio-bis [ 2-nitro-benzóico]

## II – Método

Reagentes	Volume utilizado ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final
Tampão Tris-HCL pH 8	100	75mM
DTNB	100	0,1mM
AcetilCoA 8,5 mM	50	0,42mM
Homogeneizado de músculo	10-20	-
Triton X 100 1%	100	1 ‰
H <sub>2</sub> O	q.b.p. 950	

Estabilização da absorvância a 30° C e a 412 nm

Oxaloacetato 10 mM	100	0,5 mM
--------------------	-----	--------

Leitura das absorvâncias a 412 nm durante 15 ciclos de 20 segundos .

## III - Cálculo da actividade

As actividades enzimáticas estão expressas em nanomoles de substracto transformado por minuto e por mg de proteínas nas condições de reacção escolhidas de forma a obter uma cinética que é linear em função do tempo.

A actividade específica exprime-se referida às proteínas não colagénicas (NCP).

$$U = \text{nmoles. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ NCP} = \Delta A / \Delta t \times V_t / V_a \times 1 / a_c \times d \times 1 / \text{NCP}$$

$\Delta A / \Delta t$  - variação da absorvância por minuto

$V_t$  - volume total da reacção

$V_a$  - volume da amostra

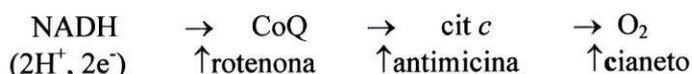
$D$  - trajecto do feixe óptico em metros

$a_c$  - absorvância/concentração  $\times d = \text{m}^2 \cdot \text{mole}^{-1}$

## B) Estudo do Complexo I; (determinação da NADH:ubiquinona oxidoreductase, EC 1.6.5.3)

## I - Princípio do método utilizado

Redução da coenzima Q (decilubiquinona) pelo NADH ; determinação em paralelo do complexo I sem e com rotenona. A diferença dos  $\Delta A / \text{min}$  corresponde à quantidade de complexo I, sensível à rotenona.



## II - Método a 30°C e 340nm

Reagentes	Volume utilizado (µL)	Concentração final
Tampão fosfato 100mM pH 7,5	350	35mM
MgCl <sub>2</sub> 100mM	50	5mM
Albumina bovina sérica (BSA) 5%	50	0,25%
NaCN 30mM	60	1,8mM
Antimicina 0,1%	2	0,0002%
Decilubiquinona* 25mM	4	0,1mM
H <sub>2</sub> O	q.b.p. 950	
Homogeneizado do músculo	50	

Estabilização da absorvância a 30° C e a 340 nm

NADH 4,5 mM	50	0,225 mM
Rotenona 10mM	6	0,06mM

Leitura das absorvâncias a 340nm.durante10 ciclos de 60 segundos.

\* 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoiquinona (C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>)

## III - Cálculo da actividade

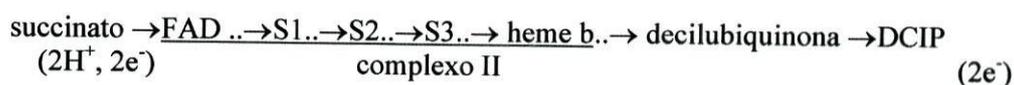
A actividade específica de NADH ubiquinona oxidoreductase (sensível à rotenona) exprime-se referida às proteínas não colagénicas (NCP). A inibição pela rotenona varia entre 50 e 80% conforme os casos.

$$U = \text{nmoles. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ NCP} = \Delta A / \Delta t \times V_t / V_a \times 1 / a_c \times d \times 1 / \text{NCP}$$

### C) Estudo do Complexo-II; (determinação da succinato:ubiquinona oxidoreductase, EC 1.3.5.1)

#### I - Princípio do método utilizado

Redução de um análogo da coenzima Q, a decilubiquinona, pelos equivalentes reduzidos do succinato transferidos pelo complexo II, e redução subsequente do 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) pelos electrões cedidos pela decilubiquinona reduzida determinando a redução do DCIP a 600 nm, último aceitador de electrões da série.



**II - Método a 30°C e 600mM**

Reagentes	Volume utilizado (µL)	Concentração final
Tampão fosfato 100mM pH 7,5	350	35mM
BSA 5%	50	2,5g/L
NaCN 30mM	8	0,24mM
Rotenona 2mM	2	0,004mM
Antimicina 0,1%	2	0,001g/L
DCIP* 0,92mM	84	0,077mM
H2O	q.b.p.990	
Succinato 320mM	31	10mM
Homogeneizado do músculo	q.b.p. 950	

Estabilização da absorvância a 30° C e a 600 nm

Decilubiquinona 25mM	3	0,075mM
----------------------	---	---------

Leitura das absorvâncias a 600nm durante 10 ciclos de 30 segundos.

Malonato de sódio	10	10mM
-------------------	----	------

\*DCIP - 2,6-diclorofenolindofenol

**III - Cálculos da actividade**

$$U = \text{nmoles. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ NCP} = \Delta A / \Delta t \times V_t / V_a \times 1 / a_c \times d \times 1 / \text{NCP}$$

**D) Estudo do Complexo II +III ; (determinação da succinato:citocromo c oxidoreductase, EC 1.3.5.1)****I - Princípio do método utilizado**

Há redução da CoQ pelos  $2\text{H}^+$ ,  $2\text{e}^-$  do succinato ; seguidamente a redução do cit *c* pelos  $2\text{e}^-$  do  $\text{CoQH}_2$  ; faz-se a determinação da redução do cit *c* a 550 nm.



## II - Método a 30°C e 550mM

Reagentes	Volume utilizado (µL)	Concentração final
Tampão de fosfato 100mM pH 7,5	550	55mM
Citocromo <i>c</i> 1mM	100	0,1mM
NaCN 30mM	30	09mM
Homogeneizado de músculo	20	
H <sub>2</sub> O	q.b.p. 1000	

Estabilização da absorvância a 30° C e a 550 nm

Succinato Na	100	3mM
--------------	-----	-----

Leitura das absorvâncias a 550mM durante 6 ciclos de 60 segundos.

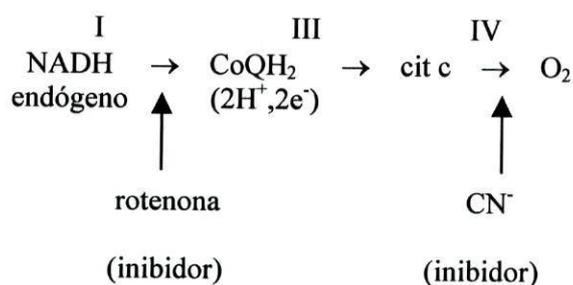
## III - Cálculos da actividade

$$U = \text{nmoles. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ NCP} = \Delta A / \Delta t \times V_t / V_a \times 1 / a_{c,d} \times 1 / \text{NCP}$$

## E) Estudo do Complexo III; (determinação da ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductase, EC 1.10.2.2)

### I - Princípio do método utilizado

Os electrões são transferidos do CoQH<sub>2</sub> (reduzido extemporaneamente) para o cit *c*; faz-se a determinação do cit *c* reduzido a 550 nm e verificação da especificidade desta determinação pela inibição do complexo III com antimicina.



**II - Método a 30°C e 550nm**

Reagentes	Volume utilizado (µL)	Concentração final
Tampão fosfato 100mM pH 7,5	350	35mM
MgCl <sub>2</sub> 100mM	50	5mM
BSA 5%	50	0,25mM
NaCN 30mM	60	1,8mM
Citocromo c 1mM	125	0,125mM
Rotenona 10mM	5	0,05mM
H <sub>2</sub> O	q.b.p. 993	
Homogeneizado de músculo	4	

Estabilização da absorvância a 30° C e a 550 nm

Decilubiquinona (reduzida) 20mM	3	0,06mM
---------------------------------	---	--------

Leitura das absorvâncias a 550nm durante 10 ciclos de 30 segundos.

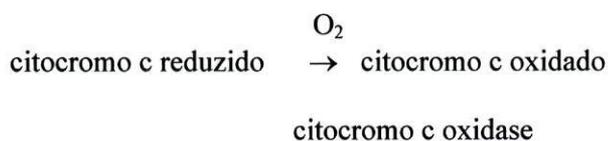
Antimicina 0,1%	3	0,0003%
-----------------	---	---------

**III - Cálculos da actividade**

$$U = \text{nmols. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ NCP} = \Delta A / \Delta t \times V_t / V_a \times 1 / a_c \times d \times 1 / \text{NCP}$$

**F) Estudo do Complexo IV; (determinação da ferrocitocromo c: oxigénio oxidoreductase ou citocromo c oxidase, EC 1.9.3.1)****I - Princípio do método utilizado**

O citocromo *c* reduzido extemporaneamente, é reoxidado pelo oxigénio dissolvido; determinação do cit *c* reduzido a 550 nm.



**II - Método a 38°C e 550nm**

Reagentes	Volume utilizado (µL)	Concentração final
Tampão fosfato 100mM pH 7	100	10mM
Citocromo reduzido (NaBH <sub>4</sub> ) 1%	100	1‰
H <sub>2</sub> O	q.b.p.1000	

Estabilização da absorvância a 38° C e a 550 nm

Homogeneizado de músculo	40	
--------------------------	----	--

Leitura das absorvâncias a 550nm durante 18 ciclos de 30 segundos.

**III - Cálculos da actividade**

$$U = \text{nmoles. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ NCP} = \Delta A / \Delta t \times V_t / V_a \times 1 / a_c \times d \times 1 / \text{NCP}$$

**Anexo II- Sintomas e sinais constantes da informação clínica registada.**

1. Hipotonia / "floppy baby"
2. Encefalopatia
3. Miopatia
4. Neuropatia
5. Atraso de desenvolvimento psicomotor (ADPM)
6. Atraso mental (AM)
7. Convulsões
8. Atraso estado-ponderal (EP)
9. Acidente vascular cerebral (AVC)
10. Surdez /baixa audição
11. Atrofia óptica / retinite pigmentar
12. S. extrapiramidal / distonia / Parkinsónico
13. S. piramidal / hiperreflexia
14. Ptose / Miopatia ocular / oftalmoparésia / oftalmoplegia externa progressiva (PEO)
15. Ataxia
16. Nistagmus
17. Cataratas
18. Atrofia cerebelosa
19. Espasticidade
20. Paraparésia
21. Caimbras
22. Microcefalia
23. Hiporreflexia
24. Hipertricose
25. Intolerância ao exercício / fadigabilidade / astenia
26. Epilepsia
27. Estrabismo
28. S. Cerebeloso
29. Dismorfias / fâcies estranho
30. Diplopia
31. Diabetes mellitus tipo II
32. Rabdomiólise / Mioglobínúria
33. Miocardiopatia / alteração cardíaca
34. Baixa estatura
35. Insuficiência pancreática
36. Vômitos
37. Pés botos
38. Movimentos involuntários
39. Mioclonias

40. Hipoglicemia
41. Prematuridade
42. Mãe com paragem cardiovascular no parto
43. Dificuldade de sucção
44. Fraqueza muscular
45. Coma
46. Discinésia
47. TAC com alterações
48. Atraso de crescimento intra-uterino
49. MELAS
50. Síndrome Leigh / NARP
51. MERRF
52. Síndrome West
53. D. mitocondrial / C. mitocondrial
54. Contracturas após-exercício
55. Miosite
56. Síndrome de dificuldade respiratória / ventilação mecânica
57. Atrofia do corpo caloso / agnesia
58. Cegueira / baixa acuidade visual
59. Miastenia
60. Quistos renais / glomeronefrite / Insuficiência renal crónica
61. Leucodistrofia
62. Distrofia muscular
63. Tremor
64. Disfagia
65. Disfonia
66. Calcificações dos gânglios da base
67. Alterações dermatológicas
68. Cifoescoliose
69. Anemia
70. Alterações de comportamento
71. Anorexia
72. Autista
73. Hemiplegia
74. Mialgias
75. Diarreia / Gastroenterite
76. S. Polimalformativo
77. RMN com alterações
78. Atingimento hepático
79. Hemiparésia
80. Trombocitopenia / trombofilia

- 81. D. Degenerativa
- 82. Artrogripose
- 83. Polipneia
- 84. KSS
- 85. LHON

### Associação de sintomas e sinais

- |  |  |
|--|--|
| <b>(ATR) Atraso</b>                        | - Coma                                 |
| - Alteração do comportamento               | - Autismo                              |
| - Microcefalia                             | - Dificuldade de sucção                |
| - Atraso do desenvolvimento psicomotor     | - Doença degenerativa                  |
| - Atraso mental                            |  |
| <b>(PEO) PEO</b>                           | <b>(CRM) Citopatia mitocondrial</b>    |
| - Diplopia                                 | - LHON                                 |
| - Estrabismo                               | - KSS                                  |
| - Ptose / oftalmoplegia                    | - MELAS                                |
| - PEO                                      | - Leigh                                |
|  | - MERRF                                |
| <b>(ATX) Ataxia</b>                        | <b>(INT) Intolerância ao exercício</b> |
| - Síndrome cerebeloso / Atrofia cerebelosa | - Caimbras                             |
| - Ataxia                                   | - Astenia                              |
| - Nistagmus                                | - Mialgias / poliartralgias            |
|  | - Intolerância ao exercício            |
| <b>(SPI) S. piramidal</b>                  | - Fatigabilidade                       |
| - Síndrome piramidal                       | - Contracturas após esforço            |
| - Espasticidade                            |  |
| - Hiperreflexia                            | <b>(MIO) Miopatia</b>                  |
| <b>(EPI) Epilepsia</b>                     | - Miopatia                             |
| - Síndrome West                            | - Miosite                              |
| - Mioclonias                               | - Síndrome de dificuldade respiratória |
| - Convulsões                               | - Polipneia                            |
| - Epilepsia                                | - Miastenia                            |
| <b>(BES) Baixa estatura</b>                | - Distrofia muscular                   |
| - Atraso estatura-ponderal                 | - Disfagia                             |
| - Baixa estatura                           | - Paraparesia                          |
| - Atraso de crescimento / IU               | - Mioglobínúria / Rabdomiólise         |
| <b>(EXT) Extrapiramidal</b>                | <b>(MAL) Síndrome Malformativo</b>     |
| - Discinésia                               | - Atrofia do corpo caloso / agnesia    |
| - Tremor                                   | - Dismorfias / facies estranho         |
| - Síndrome extrapiramidal / distonia       | - Síndrome polimalformativo            |
| - Movimentos involuntários                 | - Pés botos                            |
| <b>(ENC) Encefalopatia</b>                 | - Artrogripose                         |
| - Encefalopatia                            | <b>(SUR) Surdez</b>                    |
|  | - Surdez                               |
|  | - Baixa audição                        |

**(STR) "Stroke-like"**

- Strokes / AVC
- Hemiplegia
- Hemiparesia

**(NEU) Neuropatia**

- Neuropatia / polineuropatia
- Hiporreflexia

**(IMA) Imagiologia anormal**

- Calcificação dos glânglios da base
- Leucodistrofia
- TAC com alterações
- RMN com alterações

**(OUT) Outros**

- Prematuridade
- Paragem cardíaca

**(BXV) Baixa visão**

- Atrofia óptica
- Retinite pigmentar
- Cataratas
- Cegueira / baixa acuidade visual

**(HEM) Alterações hematológicas**

- Trombocitopenia / trombofilia
- Anemia

**(END) Alterações endócrinas**

- Insuficiência pancreática
- Hipoglicemia
- Diabetes mellitus
- Hipertricose

**(GAS) Alterações gastro intestinais**

- Diarreia / gastroenterite
- Vômitos
- Anorexia

**Associação de sinais e sintomas**

(E) Encefalopatia = ATR + ATX + SPI + EPI + EXT + ENC + STR + IMA  
 (M) Miopatia = MIO + INT

### Anexo III - Dados clínicos, miopatológicos e bioquímicos de 102 doentes com citopatia mitocondrial.

Doente / sexo	Clínica						Lactato	SDH	COX (-)	IP	Outras alterações	RRF	Estudo enzimático
1 / F	NEU	PEO	BES				2,9	P	N	-	-	P	I + IV
2 / F	ENC	END	VIS				4,5	N	N	N	glicogénio	-	I+ II+ III + IV
3 / M	PEO						-	N	N	-	f. atrofiadas	P	III
4 / F	PEO	VIS						N	-	P	f. atrofiadas	P	III+IV
5 / M	END	MIO	OUV	CAR	BES	GAS	2,8	-	P	N	-	P	I+III+IV
6 / M	MIO	MAL					3,0	P	N	P	glicogénio	N	N
7 / M	ENC							N	P	N		P	IV
8 / M	OUV	VIS	ENC	BES			3,1	N	N	N	aglom. mitoc	N	III+IV
9 / F	MIO	ENC					4,3	P	P	N	got. lipídicas glicogénio	N	IV
10 / M	PEO	MAL					-	P	N	-		N	III+IV
11 / M	ENC						3,5	-	-	-	f. atrofiadas	-	II+IV
12 / M	ENC						18,4	N	N	N		N	IV
13 / M	CM	MELAS					-	P	P	N		N	III+IV
14 / F	REN	ENC	PEO	OUV			N	N	P	P		P	I+III+IV
15 / F	APM						3,5	N	N	N		-	II
16 / F	PEO							N	N	N	glicogénio	P	III+IV
17 / F	MIO	VIS	BES	MAL	ENC	OUV	3,9	P	P	N		P	IV
18 / M	HIP	END	ENC	MAL				N	N	N		N	I+II+IV
19 / F	MIO	PEO						N	P	N		P	III+IV
20 / F	MIO	PEO						N	P	N		P	IV
21 / M	PEO	MIO						N	P	N		P	N
22 / F	MIO	ENC						N	P	N		P	I+IV
23 / M	PEO	MIO						N	P	N	f. atrofiadas	P	I+III+IV
24 / M	ENC							N	P	N		P	III+IV
25 / M	ENC	VIS	OUV					P	P	N		N	IV
26 / F	PEO							N	P	N		P	N
27 / M	PEO							N	P	N		P	IV
28 / M	MIO							N	P	N		P	III+IV
29 / M	MIO	GAS	CAR	BES			6,2	P	N	N		P	I+III+IV
30 / F	PEO							N	P	N		P	III+IV
31 / M	KSS							P	P	P		N	III+IV
32 / F	PEO	MIO						N	P	N		P	III
33 / M	NARP						3,9	-	-	-		-	n.d.
34 / M	ENC	NEU					N	-	-	-		N	III
35 / M	VIS	ENC					3,0	N	N	N		N	III+IV
36 / F	PEO							P	N	N		P	III
37 / M	ENC							N	N	N		N	III
38 / F	PEO	BES	END					P	N	N		P	N
39 / F	KSS						3,2	N	P	P		P	N
40 / F	KSS							-	P	N		P	n.d.
41 / M	CAR							P	N	S		P	III+IV
42 / F	PEO	VIS	MIO					S	N	S		P	IV
43 / F	KSS							P	N	S		P	III
44 / M	LHON							-	-	-		-	n.d.
45 / F	PEO							N	P	N		P	III+IV
46 / M	CM	MERRF					N	N	/	N		N	IV
47 / M	ENC							N	P	P	glicogénio	P	III
48 / M	HIP						7,8	N	N	N		N	IV
49 / F	PEO	MIO						-	-	-		P	N
50 / M	PEO	MIO						N	N	N	f. atrofiadas	N	IV

Doente / sexo	Clínica					Lactato	SDH	COX (-)	IP	Outras alterações	RRF	Estudo enzimático
51 / F	ENC	VIS	OUV			5,4	P	P	N		N	II+IV
52 / F	PEO	MIO	ENC				N	N	N		P	N
53 / M	PEO						N	P	N		P	IV
54 / M	CM	LHON					-	-	-		-	n.d.
55 / F	ENC					11,4	P	N	N		N	III+IV
56 / M	HIP	ENC	Leigh			3,1	N	N	N		N	N
57 / M	ENC	VIS				3,6	N	P	N		P	IV
58 / F	MIO						N	P	N	corpos inclus	P	N
59 / F	HEP	ENC	GAS	END	MIO	17,7	N	-	N	megamitoc	N	II+IV
60 / F	ENC	VIS	MIO				-	-	-		N	I+II+III+IV
61 / M	PEO						P	P	N		P	IV
62 / M	KSS						N	N	N		P	N
63 / F	MIO						P	P	N		N	IV
64 / F	MIO	ENC	NEU				N	N	N		N	I+IV
65 / F	CM	KSS					-	N	N		P	N
66 / F	PEO						P	N	N		P	N
67 / F	CAR	MIO	VIS				N	N	N	glicogénio e lípidos	N	IV
68 / M	MIO	ENC	VIS			2,6	P	N	N		P	II+III+IV
69 / M	VIS	MIO	ENC	MAL	BES	3,8	N	P	N		P	III+IV
70 / M	HIP	END				7,8	-	-	-		-	I+IV
71 / M	VIS	MIO	HEM			2,9	N	N	N		N	IV
72 / F	MAL	HEP	END			3,9	-	-	-		-	IV
73 / M	CM	Leigh				4,5	N	N	N		P	I+IV
74 / F	MIO	CAR				3,0	N	N	N		N	IV
75 / M	ENC	VIS					N	N	N		N	IV
76 / F	ENC	HEP				5,1	N	N	S	megamito	N	I+IV
77 / F	CM	KSS				3,1	P	P	-		P	N
78 / F	CM	MNGIE				N	-	-	-		P	N
79 / M	ENC					-	-	-	-		N	I+IV
80 / F	MIO						P	P	N		N	I+IV
81 / M	MIO						N	N	N		N	I+II+IV
82 / M	MIO					4,2	N	N	N		P	I+II+III+IV
83 / M	CAR	HIP	ENC			3,5	N	N	N		N	II+IV
84 / F	PEO	BES				-	P	P	N		P	I
85 / M	PEO	Famil.				-	N	N	S		N	N
86 / F	CM	Leigh				3,3	N	N	N		N	N
87 / F	NARP						-	-	-		-	n.d.
88 / M	ENC	HEM				-	N	P	N		P	N
89 / F	PEO	MIO				-	-	-	-		P	N
90 / F	CM	Leigh				3,1	N	N	N		N	IV
91 / F	CM	MERRF				3,4	N	N	N	lípidos	N	IV
92 / M	ENC	MIO					N	N	P		P	IV
93 / M	PEO						P	P	N		P	I+IV
94 / M	MIO						N	P	N		P	I
95 / M	KSS						P	P	N		P	I+II+III+IV
96 / F	PEO						N	N	P		P	N
97 / M	ENC					4,2	N	N	N		N	II
98 / M	ENC	CAR	HEP	HIP		5,3	N	N	N		N	IV
99 / M	MIO	CAR				4,3	N	N	N	atof. neurog	N	IV
100 / F	END	ENC	BES			2,8	P	N	N		P	n.d.
101 / F	OUV	ENC	VIS	BES	MIO		P	N	N		P	n.d.
102 / M	CM	LHON					-	-	-		-	n.d.

Abreviaturas: n.d.–não determinado; N-negativo; P-presença; COX (-)-fibras COX negativas; IP - Inclusões paracristalinas

### Anexo IV - Resultados da determinação das actividades enzimáticas dos complexos da CRM.

Doente/ Sexo	Idade à biópsia	CS	Complexo I NADHCR	Complexo II SDH	Complexo III CCR	Complexo IV COX	Resultados
1/F	45A	214,0	1,2	20,1	25,3	9,2	Défice I; IV
2/F	15M	226,9	1,2	5,4	6,7	1,6	Défice I; II; III; IV
3/M	41A	200,0	14,5	15,0	16,5	18,3	Défice III
4/F	69A	124,9	12,9	18,0	15,9	7,1	Défice III; IV
5/M	10A	306,0	1,4	17,7	15,2	3,4	Défice I; III; IV
6/M	11A	140,7	15,4	24,5	25,8	22,8	Normal
7/M	44A	116,0	13,0	22,0	37,0	8,0	Défice IV
8/M	12A	229,9	11,1	17,0	13,8	5,9	Défice III; IV
9/F	47A	91,7	7,6	15,7	35,3	4,5	Défice IV
10/M	7A	263,6	13,0	11,2	10,9	3,3	Défice III; IV
11/M	10M	78,5	18,7	9,0	49,2	6,1	Défice II; IV
12/M	5A	128,5	17,4	12,3	40,2	5,5	Défice IV
13/M	12A	186,7	25,2	12,1	8,8	9,2	Défice III; IV
14/F	4A	120,7	6,3	14,0	13,5	4,4	Défice I; III; IV
15/F	1A	125,9	10,9	8,6	49,4	10,1	Défice II
16/F	33A	259,8	9,3	18,6	13,6	4,6	Défice III; IV
17/F	33A	119,7	14,9	11,2	67,7	8,2	Défice IV
18/M	7A	130,0	4,6	5,6	43,6	14,3	Défice I; II
19/F	34A	157,7	17,5	19,4	25,2	5,8	Défice IV
20/F	73A	137,9	18,9	14,7	25,2	5,8	Défice IV
21/M	59A	143,7	16,0	11,0	40,0	16,0	Normal
22/F	5A	279,7	5,4	24,0	25,4	3,9	Défice I; IV
23/M	33A	272,4	3,0	36,5	12,6	5,7	Défice I; III; IV
24/M	8A	108,6	14,4	18,2	16,9	9,0	Défice III; IV
25/M	46A	205,8	11,2	13,0	23,4	8,2	Défice IV
26/F	61A	358,2	14,9	29,7	24,1	9,1	Normal
27/M	29A	136,5	10,2	14,5	27,3	5,9	Défice IV
28/M	39A	177,8	16,7	18,8	11,7	8,3	Défice III; IV
29/M	6A	301,0	2,9	16,4	9,2	2,9	Défice I; III; IV
30/F	37A	188,0	10,6	14,4	18,0	7,5	Défice III; IV
31/M	17A	197,4	30,4	34,6	12,0	5,8	Défice III; IV
32/F	43A	97,9	24,2	46,8	15,5	19,0	Défice III
33/M	15A	-	-	-	-	-	n.d.
34/M	30A	191,3	20,2	26,3	12,7	12,3	Défice III
35/M	7A	120,2	12,9	13,7	11,7	4,6	Défice III; IV
36/F	35A	112,5	19,3	25,3	19,4	15,2	Normal
37/M	35A	96,3	14,8	26,9	13,3	16,8	Défice III
38/F	52A	130,9	14,6	35,6	41,6	15,7	Normal
39/F	17A	169,8	24,0	25,9	45,0	18,8	Normal
40/F	24A	-	-	-	-	-	n.d.
41/M	20A	149,4	18,3	14,9	18,3	7,1	Défice III; IV
42/F	24A	103,6	17,6	23,7	25,9	9,6	Défice IV
43/F	12A	137,7	9,1	19,8	26,0	16,9	Normal
44/M	32A	-	-	-	-	-	n.d.
45/F	69A	98,5	23,0	20,5	16,1	7,7	Défice III; IV
46/M	15A	129,4	18,1	24,1	46,2	5,8	Défice IV
47/M	68A	89,4	17,7	14,5	16,9	17,2	Défice III
48/M	2M	69,2	14,1	29,0	91,8	3,1	Défice IV
49/F	46A	150,2	15,9	20,3	25,3	17,9	Normal
50/M	5A	136,5	10,2	14,5	27,3	5,9	Défice IV
51/F	4M	67,8	8,9	3,9	28,7	2,1	Défice II; IV
52/F	59 <sup>A</sup>	114,4	27,4	19,2	36,8	9,8	Normal
53/M	71 <sup>A</sup>	114,7	14,4	17,9	25,5	9,8	Défice IV
54/M	-	-	-	-	-	-	n.d.

Doente/ Sexo	Idade à biópsia	CS	Complexo I NADHCR	Complexo II SDH	Complexo III CCR	Complexo IV COX	Resultados
55/F	6 <sup>A</sup>	132,2	8,2	18,3	13,0	6,1	Défice III; IV
56/M	1A	108,9	33,7	14,6	32,2	14,9	Normal
57/M	43A	68,1	25,4	14,5	37,5	8,8	Défice IV
58/F	45A	96,5	12,8	17,2	27,9	16,5	Normal
59/F	3A	196,2	11,2	6,5	27,7	4,8	Défice II; IV
60/F	9M	290,2	4,6	7,4	12,0	3,8	Défice I; II; III; IV
61/M	31A	74,9	18,3	18,7	25,2	2,8	Défice IV
62/M	68A	193,2	10,4	21,9	23,1	16,6	Normal
63/F	38A	156,4	20,4	18,9	33,7	7,7	Défice IV
64/F	8A	87,0	5,5	17,2	45,5	6,0	Défice I; IV
65/F	24A	112,4	16,2	21,4	46,5	18,5	Normal
66/F	18A	121,3	12,7	28,1	21,4	11,0	Normal
67/F	16A	84,0	22,9	19,1	65,4	7,5	Défice IV
68/M	11A	257,5	18,2	5,0	11,4	4,7	Défice II; III; IV
69/M	7A	177,1	5,9	9,6	15,4	6,6	Défice I; II; III; IV
70/M	1,5A	341,3	2,3	13,4	20,8	4,3	Défice I; IV
71/M	19A	248,0	16,5	17,8	35,9	7,5	Défice IV
72/F	13A	138,3	12,4	22,2	45,3	5,6	Défice IV
73/M	10A	146,5	1,3	13,6	34,3	2,5	Défice I; IV
74/F	7A	133,2	7,3	40,7	35,8	1,9	Défice IV
75/M	12A	255,7	10,5	23,8	20,6	7,7	Défice IV
76/F	1A	120,4	6,6	25,1	35,6	5,0	Défice IV
77/F	13A	177,5	18,8	14,6	23,9	16,1	Normal
78/F	8A	160,5	16,6	19,0	24,3	18,6	Normal
79/M	8A	261,5	5,5	12,3	21,1	2,3	Défice I; IV
80/F	23A	84,4	4,0	13,6	41,7	8,2	Défice I; IV
81/M	24A	113,2	3,8	3,5	47,6	7,4	Défice I; II; IV
82/M	2A	476,3	3,1	4,4	19,6	0,8	Défice I; II; III; IV
83/M	5A	241,0	6,5	8,7	26,7	3,1	Défice II; IV
84/F	26A	141,0	5,0	24,1	25,9	13,2	Défice I
85/M	8A	215,3	22,2	17,6	49,6	10,1	Normal
86/F	5A	93,4	13,0	25,0	44,2	20,9	Normal
87/F	15A	-	-	-	-	-	n.d.
88/M	19A	107,7	18,4	20,8	26,1	16,5	Normal
89/F	46A	92,3	18,5	23,0	49,6	27,9	Normal
90/F	3A	112,5	13,5	12,9	36,8	7,6	Défice IV
91/F	15A	142,5	7,3	13,4	24,0	3,8	Défice IV
92/M	55A	109,3	14,6	19,9	48,7	8,1	Défice IV
93/M	32A	476,7	3,1	16,5	18,3	5,2	Défice I; IV
94/M	41A	108,7	5,1	18,8	26,5	15,3	Défice I
95/M	21A	181,7	4,3	8,4	10,4	5,7	Défice I; II; III; IV
96/F	47A	120,5	15,7	14,9	46,0	16,9	Normal
97/M	5A	130,2	17,4	8,5	29,6	14,3	Défice II
98/M	4A	217,9	19,7	19,0	36,7	9,5	Défice IV
99/M	11A	94,5	12,3	11,5	33,2	4,6	Défice IV
100/F	23A	-	-	-	-	-	n.d.
101/F	25A	-	-	-	-	-	n.d.
102/M	17A	-	-	-	-	-	n.d.

VR n=50\*      85,0 - 180,    7,0 - 21,0    12,0 - 35,0    22,2 - 62,2    11,5 - 34,5

CS (citrato sintetase), enzima da matriz mitocondrial; NADHCR (rotenona sensível) - NADH-CoQ redutase; SDH - succinato desidrogenase; CCR - citocromo c redutase; COX - citocromo oxidase; (\*) unidades nmol/min/mg proteínas não colagénicas; VR: valores de referência.

**Anexo V – Primers do mtDNA utilizados neste estudo na pesquisa de mutações menos frequentes**

<i>Primer</i>	Posição 5'	Sequência do primer (5'→3')
<b>Bal 321F</b>	311	CCCCGCTTCTGGCCACAGCAC
<b>NlaIII 694B</b>	704	ATGCTTGCATGTGTAATCTTAC
<b>1009 F</b>	1009	CACAAAATAGACTACGAAAGTGGC
<b>Apa 1462F</b>	1460	CAGGGCCCTGAAGCGCGTACAC
<b>1575B</b>	1575	ACTTACCATGTTACGACTGG
<b>Hha 1768B</b>	1776	CTATTGCGCCAGGTTTCAATTC
<b>Stu 2172F</b>	2164	CCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCC
<b>Rsa 3123F</b>	3116	CCTCCCTGTACCAAAGGAC
<b>3173F</b>	3157	TAAGATGGCAGAGCCCG
<b>Suppe F</b>	3230	GTTAAGATGGCAGCGCCCGTAAGCG
<b>3260 B</b>	3282	GAGGAATTGAACCTCTGTAAAGGAATAAGTT
<b>3250 F</b>	3148	GGTTTGTTAAGATGGCAGAGGCCGG
<b>3291F</b>	3264	TTAAAACTTTACAGTCAGAGGTTCCGATTC
<b>MELAS 3295 B</b>	3295	GAGGAATTGAACCTCTGACTCTAA
<b>3303 F</b>	3277	GTCAGAGGTTCAATTCCTCTTGTT
<b>Rsa 3337B</b>	3353	GCGATTAGAATGGGTACAATG
<b>3341B</b>	3341	GGTACAATGAGGAGTAGGAGGTTGGCACTG
<b>3423B</b>	3348	CACGTTGGGGCCTTTGCGTA
<b>Mae 4198F</b>	4185	CCTACCACTCACCTAGCATTAC
<b>FokI 4237B</b>	4349	GTTCGATTCTCATAGTCCTAG
<b>HaeII 4529B</b>	4544	GTGCGAGCTTAGCGCTGTGATG
<b>HpaI 5685F</b>	5685	CACTTAGTTAACAGCTAAGCACCC
<b>Hha 5971B</b>	5982	CAGCTCATGCGCCGAATAATAGG
<b>Xba 7440F</b>	7433	CATAAAATCTAGACAAAAAAGGAAGGAATCGAAC
<b>Bcl 7657B</b>	7669	GAGGGCGTGATCATGAAAGGTG
<b>Bst 7973F</b>	7955	CCCCATTATTCTAGAACAGGCCG
<b>Apa 8249F</b>	8239	CTTTGAAATAGGGCCCGTATTTACC
<b>Xba 8289F</b>	8273	CCCCTCTACCCCTCTAGAGCCCACTGTAAAGC
<b>Ban 8344B</b>	8372	GGGGCATTCTACTGTAAAGAGGTGTGGG
<b>MERRF 8356B</b>	8380	ATTTAGTTGGGGCATTTCACTTTA
<b>Stu 8571B</b>	8582	GCGGGTAGGCCTAGGATTGTGG
<b>8829F</b>	8829	CCTAGCCATGGCCATCCCCGTATG

<b>Primer</b>	<b>Posição 5'</b>	<b>Sequência do primer (5'→3')</b>
<b>8896F</b>	8896	GCCCTAGCCCACTTCTTAC
<b>9203B</b>	9203	GTGTTGTCGTGCAGGTAGAGGCTTCCT
<b>Apa 9265B</b>	9298	GGGTGAGAGGGCCCCTGTTAGG
<b>Asu 9910F</b>	9902	CTTTGGCTTCGAAGCCGCGCC
<b>COX3 9950B</b>	9950	AACCACATCTACAAAATGCC
<b>Xba 10256B</b>	10269	GGGCAATTTCTAGATCAAATAATAAGAAGG
<b>Xba 10256F</b>	10240	CCTTCTTATTATTTGATCTAGAAATTGCC
<b>Hae 10364F</b>	10354	CCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGAC
<b>Spe 10526B</b>	10542	GTGAGCGATATACTAGTATTCTAG
<b>Hind 11680F</b>	11668	CCAAACCCCCTGAAGCTTCACCGGCGCAG
<b>Hpa 12123F</b>	12106	CAACCCCGACATCATTACCGGGT
<b>Hinc 12406B</b>	12413	GGGTTAACGAGGGTGGTAAGG
<b>Eco 12640B</b>	12653	CACAGTGAGAATTCTATGATGGACC
<b>Stu 13705B</b>	13720	GGCTTCCGGCTGCCAGGCCTTAATGGGG
<b>FokI 13750B</b>	13750	GTTGTTAGTAATGAGAAATTCTGCG
<b>SAU 14.4F</b>	14463	TAGTATATCCAAAGACAACGA
<b>EcoRI 14538B</b>	14538	TTTGGGGGAGGTTATATGGG
<b>Dde 14608F</b>	14601	GAGAAGGCTTAGAAGAAAACCCAC
<b>Taq 14803B</b>	14810	GGAGGTCGATGAATGAGTGG
<b>Taq 14967B</b>	14967	TTTACGTCTCGAGTGATGTGGGCG
<b>LHON 15257 F</b>	15155	CAAATATCATTCTGAGGGTCGACAG
<b>LHON 15257B</b>	15304	GGGCAAGATGAAGTGAAAGG
<b>Mbo 15591B</b>	15600	GGGACGGATCGGAGAATTGTGTAGGCG
<b>Rsa 15812F</b>	15803	GTAGCATCCGTAATACTTAC
<b>Kpn 16048B</b>	16060	CTTGGGTGGTACCCAAATCTGCTTCCCC

## Anexo VI - Resultados moleculares globais

Dados clínicos, morfológicos e enzimáticos de 50 doentes deste estudo em que foram identificadas mutações do mtDNA.

Doente	Idade à biópsia (anos)/sexo	Fenótipo Clínico	Miopatologia	Défice Enzimático da CRM	Tamanho da deleção (Kb)	Percentagem de deleção no músculo
D1	45 / F	PEO/Neuropatia	RRF (++)	I e IV	2,4	80
D19	34 / F	PEO/Miopatia	RRF (++)	IV	4,9	49
D4	69 / F	PEO	RRF (+)	III e IV	7,6	18
D23	33 / M	PEO/Miopatia	RRF (+++)	I, III e IV	4,9	85
D31	17 / M	KSS incompleto	SDH (+)	III e IV	4,9	56
D27	29 / M	PEO	RRF (+)	IV	4,9	50
D30	37 / F	PEO	RRF (++)	III e IV	7,6	33
D32	43 / F	PEO/Miopatia	RRF (+)	III	2,7	48
D24	8 / M	S. Leigh-like	RRF (+)	III e IV	4,9	61
D43	12 / F	KSS	RRF (+)	Normal	7,6	16
D39	17 / F	PEO/Encefalopatia	RRF (+++)	Normal	4,9	55
D61	31 / M	PEO	RRF (++)	IV	7,6	22
D68	7 / M	Atingimento multissistémico	RRF (+++)	III e IV	7,6	52
D42	24 / F	PEO/Miopatia	RRF (+)	III e IV	4,9	61
D96	47 / F	PEO	RRF (+)	Normal	4,9	24
D80	23 / F	Miopatia	SDH (+)	I, II e IV	4,9	26
D84	26 / F	PEO	RRF (++)	I	2,4	91
D94	41 / M	Miopatia	RRF (+++)	I	4,9	59
D95	21 / M	KSS	RRF (+)	I, II, III e IV	5,6	92
D45	69 / F	PEO	RRF (+)	III e IV	4,9	60
D93	32 / M	PEO	RRF (++)	Normal	4,9	75
D62	68 / M	KSS	RRF (+)	Normal	4,9	55
D16	33 / F	PEO / disfagia / paresia facial oculo-faríngea	RRF (++)	III e IV	4,9	98
D77	13 / F	KSS	RRF (++)	Normal	4,9	81
D65	24 / F	PEO	RRF (++)	Normal	7,6	28
D40	24 / M	KSS	n.d.	n.d.	4,9	16 (sangue)
D66	18 / F	PEO	RRF (++)	III e IV	5,1	87

(cont.)

Doente	Idade à biópsia (anos)/ sexo	Fenótipo Clínico	Miopatológico	Défice Enzimático da CRM	Mutação
D85	8 / M	PEO familiar	Inclusões paracristalinas	Normal	Deleções múltiplas
D58	45 / F	Miopatia	Miosite - corpos de inclusão	Normal	Deleções múltiplas
D89	46 / F	PEO / fadiga fácil e dores musculares	RRFs	Normal	Deleções múltiplas
D78	32 / F	MNGIE	RRFs	Normal	Deleções múltiplas
D49	46 / F	PEO / fraqueza muscular	FRS	Normal	Deleções múltiplas
D53	71 / M	PEO	RRFs	IV	Deleções múltiplas
D2	1 / F	Encefalopatia, cataratas	Alterações inespecíficas	I, II, III, IV	Depleção

Doente	Idade à biópsia (anos) / sexo	Fenótipo Clínico	Miopatológico	Défice Enzimático da CRM	Mutação Pontual
D5	12 / M	MELAS	RRFs	I, III, IV	A3243G
D29	6 / M	Cardiomiopatia	RRFs	I, III, IV	A3243G
D38	52 / F	PEO-DM	RRFs	Normal	A3243G
D72	10 / M	S. de Leigh	RRFs	I, IV	A3243G
D101	20 / F	MELAS	RRFs	n. d.	A3243G
D100	28 / F	MELAS	RRFs	n. d.	A3243G
D28	32 / M	Miopatia	RRFs	III, IV	A8344G
D91	11 / F	MERRF	Alterações inespecíficas	IV	A8344G
D90	3 / F	SL	Normal	IV	T8993G
D56	1 / M	SL	Normal	Normal	T8993G
D86	5 / F	SL	Normal	Normal	T8993G
D33	15 / M	NARP	Normal	Normal	T8993C
D87	15 / F	NARP	Normal	Normal	T8993C
D102	17 / M	LHON	-	-	G11778A
D44	32 / M	LHON	-	-	G11778A
D54	25 / M	LHON	-	-	G11778A

Abreviaturas: PEO-DM-PEO diabetes mellitus; n.d.- não determinado; F-feminino; M-masculino;

## Resumo

As doenças mitocondriais constituem um grupo heterogéneo de doenças que se caracterizam por alterações da estrutura mitocondrial e deficiência da fosforilação oxidativa (OXPHOS). Nos últimos anos foram identificadas no DNA mitocondrial (mtDNA) numerosas mutações associadas a síndromes clínicas, a maioria dos quais envolvendo o músculo esquelético e o cérebro. Contudo, como as mitocôndrias são organelos ubiquitários, os défices da OXPHOS podem afectar qualquer órgão ou tecido do organismo, o que conduz ao conceito alargado de citopatias mitocondriais (CM).

De início, o diagnóstico das CM era feito com base nos dados clínicos e na identificação de anomalias nas biópsias musculares. Mais tarde, estudos bioquímicos sistemáticos permitiram a caracterização de défices isolados ou combinados dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Rapidamente se constatou, no entanto, que nem os dados morfológicos nem os bioquímicos isoladamente permitiam uma classificação sistemática das CM. Os progressos na genética molecular vieram dar um melhor conhecimento das suas bases genéticas, disponibilizando novos meios de diagnóstico e formas de classificação.

O objectivo do nosso trabalho foi iniciar os estudos bioquímicos da actividade da OXPHOS em Portugal e disponibilizar a investigação molecular do mtDNA nas CM.

A primeira parte do trabalho consistiu numa abordagem multidisciplinar de 435 doentes portugueses com apresentação clínica ou dados laboratoriais sugestivos de patologia mitocondrial. Destes doentes, 102 (com idades compreendidas entre 1,5 meses e 74 anos) tinham evidência clínica, morfológica e/ou bioquímica de CM.

Na segunda parte do estudo é abordada a estratégia utilizada na investigação molecular. Em 50 dos 102 doentes foi possível caracterizar as mutações responsáveis, abrangendo 11 alterações patogénicas diferentes. O espectro mutacional do mtDNA revelou deleções simples de grandes dimensões em 27 casos, depleção do mtDNA num, deleções múltiplas em seis e mutações pontuais em 16 casos: mutação A3243G em seis, A8344G em dois, T8993G/C em cinco e G11778A em três. Este estudo permitiu ainda a identificação de 27 polimorfismos em diferentes genes do mtDNA, dos quais 8 não estavam descritos.



R= 8801

A heterogeneidade clínica, patológica, bioquímica e molecular encontrada nos nossos doentes, veio sublinhar o problema da variabilidade da expressão fenotípica associada a cada mutação do mtDNA.

Com este estudo concluímos que: i) a apresentação clínica do grupo das encefalopatias é variável e não corresponde à de nenhum grupo sindrómico previamente descrito; ii) não é possível prever o défice enzimático nem a alteração genética do mtDNA com base exclusivamente na apresentação clínica; iii) os estudos enzimáticos confirmam o diagnóstico em doentes que apresentam estudos miopatológicos normais; iv) as mutações patogénicas do mtDNA são comuns e causam morbidade crónica significativa; v) os estudos genéticos são úteis para distinguir os casos esporádicos dos de transmissão materna, o que permite a realização de um aconselhamento genético adequado.

Este estudo, o primeiro efectuado em doentes portugueses, confirma os dados já publicados enfatizando a utilidade da caracterização molecular num diagnóstico de certeza e levando a um melhor conhecimento destas doenças, não tão raras como inicialmente se supunha.

De futuro, iremos proceder à sequenciação completa do mtDNA em todos os doentes em que não foi ainda possível efectuar uma caracterização molecular e também alguns estudos do genoma nuclear nos casos com deficiência da OXPHOS em que o estudo do mtDNA não revelou mutações. Além disso, o desenvolvimento de modelos celulares relativamente simples tornará possível detectar quais as necessidades metabólicas exactas das células com disfunção da OXPHOS e testar diferentes condições de cultura ou de tratamento tanto em células mutadas como nas normais. Estes estudos poderão fornecer informações importantes sobre estas doenças, frequentemente fatais. Permitirão ainda desenvolver estratégias para a destruição ou inibição da replicação de determinados tipos de DNA.

## Summary

Mitochondrial diseases are a heterogeneous group of metabolic disorders characterized by abnormalities of the mitochondrial ultrastructure and impaired oxidative phosphorylation (OXPHOS). In the past years, the study of mitochondrial DNA (mtDNA) showed in a number of cases specific mutations associated with clinical syndromes mostly affecting skeletal muscle and brain. However, since mitochondria are ubiquitous, OXPHOS defects might affect any organ or tissue in the body. This leads to a broader concept of mitochondrial cytopathies (MC).

Initially, the diagnosis was based on clinical features and on the presence of abnormalities in the muscle biopsy specimens. Later, systematic biochemical studies led to the identification of single or multiple defects in the mitochondrial respiratory chain complexes. It soon became evident that neither morphological nor biochemical data alone could provide a systematic classification of MC. Advances in molecular genetics have increased our understanding of the genetic bases of these diseases, providing new tools for classification and diagnosis.

The aim of this work was to analyse OXPHOS activity in Portuguese patients and set up the molecular study for mtDNA abnormalities.

The first part of the project aimed at a multidisciplinary approach in 435 Portuguese patients who had clinical presentations or laboratory features suggestive of mtDNA-associated disorders. Among these patients, 102 (48 women and 54 men, age range 1.5 mo-74 yrs) showed clinical, morphological and/or biochemical evidence of MC. The group of patients proved to be representative of this type of pathology because it was composed by 49 children and 53 adults with a wide range of clinical and biochemical phenotypes.

The second part of the work dealt with the strategy of the molecular investigation. Out of 102 patients with MC, we characterized the disease causing mutations in 50 individuals with 11 different pathogenic changes. The mutational spectrum of the population under study revealed single large-scale mtDNA deletions in 27 patients, depletion in one and multiple deletions in 6 patients. MtDNA point mutations were found in 16 patients: the A3243G mutation in six, the A8344G in two, the T8993G/C in five, and G11778A in three. This study also allowed the detection of 26 polymorphisms in different genes of mtDNA, 8 of which are new.

As a whole, the clinical, pathological, biochemical and molecular heterogeneity in our patients underline the problem of the variability of the phenotypic expression associated with mtDNA mutations. We conclude that: i) the clinical presentation is quite variable and does not correspond to any former syndrome classification; ii) results from enzymatic and genetic analyses are not predictable on the sole basis of clinical presentation; iii) enzyme studies may confirm the diagnosis in the patients despite normal pathological studies; iv) pathogenetic mtDNA mutations are common and cause significant chronic morbidity; v) genetics studies are useful to differentiate sporadic from maternal-inherited cases, allowing a better genetic counselling.

This study, the first in Portuguese patients, confirms published data and emphasises the usefulness of genetic testing to reach a correct diagnosis. In future years, our research will go a step further in patients without molecular characterization. We will sequence the entire mtDNA. Further research for genetic defects in the nuclear genome will be also undertaken in OXPHOS-deficient patients negative for mtDNA mutations. The development of relatively simple cellular models will make possible to address the exact metabolic requirements for cells with OXPHOS impairment and to test different growth conditions or treatments in both mutated and wild type genomes. Such studies may provide useful insights as for the pathogenesis of these disorders, and will allow to devise possible strategies to impair or inhibit one type of DNA in its replication.

## Résumé

Les maladies mitochondriales sont un groupe hétérogène de maladies métaboliques caractérisées par des anomalies ultrastructurelles des mitochondries et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Récemment, l'étude de l'ADN mitochondrial (ADNmt) a permis l'identification d'un nombre considérable de mutations spécifiques associées à des syndromes cliniques avec atteinte préférentielle du cerveau et du muscle strié. Étant donné que les mitochondries sont ubiquitaires, les défauts OXPHOS peuvent, cependant, affecter n'importe quel organe ou tissu, ce qui élargi le concept de cytopathie mitochondriale (CM).

Le diagnostic était au départ basé sur les manifestations cliniques et la présence d'anomalies de la biopsie musculaire. L'étude biochimique a permis plus tard l'identification de défauts uniques ou multiples des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Aucun de ces défauts ne peut cependant aboutir à une classification des CM. Le progrès de la génétique moléculaire a donné une contribution majeure pour la compréhension des bases génétiques de ces maladies.

L'objectif de notre travail a été l'analyse biochimique et moléculaire de 102 malades portugais (âgés de 1,5 mois à 74 ans) avec évidence morphologique et/ou biochimique de CM, couvrant un grand spectre de phénotypes cliniques et biochimiques.

Nous avons caractérisé les mutations responsables (11 altérations pathogéniques différentes) chez 50 malades, un grand nombre de délétions du ADNmt chez 27 malades, des délétions multiples chez 6 malades et un cas de déplétion. Des mutations ponctuelles du ADNmt ont été identifiées chez 16 malades. Cette étude a aussi permis la détection de 26 polymorphismes en gènes différents du ADNmt, dont 8 nouveaux.

À l'hétérogénéité pathologique, biochimique et moléculaire correspond la variabilité phénotypique associée aux mutations du ADNmt. Nous concluons que: i) la présentation clinique est très variable et ne correspond à aucune classification syndromatique antérieure; ii) les résultats de l'analyse enzymatique et génétique ne sont pas prévisibles d'après la présentation clinique; iii) l'étude enzymatique confirme le diagnostic malgré une étude pathologique normale; iv) les mutations pathologiques du ADNmt sont fréquentes et responsables par une morbidité chronique significative; v)

l'étude génétique est utile pour le diagnostic différentiel entre les cas sporadiques et ceux hérités par voie maternelle, permettant un conseil génétique plus précis.

Cette étude, effectuée pour la première fois au Portugal, confirme les résultats de travaux antérieurs et la contribution de l'analyse moléculaire à un diagnostic précis. Notre intention est de l'étendre dans l'avenir au génome nucléaire chez les malades avec déficit de l'OXPPOS dont l'étude de l'ADNmt n'a pas mis en évidence des mutations. Le développement de modèles cellulaires relativement simples permettra aussi d'évaluer les nécessités métaboliques exactes des cellules avec des déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale et de tester différentes conditions de culture ou de traitement des cellules normales et mutées. Ces études pourront donner des renseignements importants sur ces maladies et permettront d'établir les stratégies visant la destruction ou l'inhibition spécifiques de la répllication de différents types d'ADN.

oferta  
4.000,00  
00.10.23

BIBLIOTECA  
DO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
"ABEL SALAZAR"