

*Genoma Mitocondrial e
Défice Energético no Diagnóstico das
Doenças da Cadeia Respiratória
Mitocondrial*

**Maria Manuela Monteiro Grazina
Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra
2004**

Genoma Mitocondrial e Défice Energético
no Diagnóstico das Doenças da Cadeia Respiratória Mitocondrial

Maria Manuela Monteiro Grazina



Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de Coimbra, para
prestação de Provas de Doutoramento em
Ciências Biomédicas.

Coimbra, 30 de Julho de 2004

Índice de texto

	Página
1. Introdução	1
1.1 A Mitocôndria: estrutura e função	3
1.2 A CRM	11
1.2.1 Complexo I – NQR	17
1.2.2 Complexo II – SQDR	18
1.2.3 Complexo III – QCCR	19
1.2.4 Complexo IV – COX	20
1.2.5 Gradiente electroquímico	21
1.2.6 Complexo V – ATPase	23
1.2.7 Síntese de ATP	23
1.2.8 Inibidores e desacopladores da CRM	24
1.2.9 O tecido adiposo castanho	26
1.3 A mitocôndria e o stresse oxidativo	26
1.4 A mitocôndria e a morte celular por apoptose	30
1.4.1 A permeabilidade de transição mitocondrial (MPT)	33
1.5 O genoma mitocondrial (mtDNA)	34
1.6 Importação proteica mitocondrial	43
1.7 As mitocondriopatias ou doenças da cadeia respiratória mitocondrial (DCRM)	46
1.7.1 Apresentação e classificação clínica	50
1.7.2 Classificação bioquímica e genética	60
1.7.2.1 Alterações do mtDNA	65
1.7.2.2 Alterações do nDNA	69
1.7.2.3 Alterações na comunicação intergenómica	73
1.7.3 Métodos de diagnóstico	75
1.7.3.1 Avaliação do estado redox (plasma e LCR)	76
1.7.3.2 Estudos polarográficos da CRM	76
1.7.3.3 Estudos de oxidação de substratos	77
1.7.3.4 Estudos espectrofotométricos da CRM	78
1.7.3.5 Estudos histopatológicos	78
1.7.3.6 Estudos de genética molecular	80
1.7.3.7 Ressonância Magnética de Imagem e Espectroscópica de Músculo e Cérebro	81

Índice de texto [*continuação*]

	Página
1.7.4 Défices da CRM	82
1.7.5 Implicações noutras vias metabólicas	85
1.7.6 Critérios de diagnóstico	87
1.7.7 Aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal	88
1.7.8 Estratégia de tratamento	93
1.7.9 LHON, um exemplo de DCRM	95
1.7.10 Doenças neurodegenerativas com alterações secundárias da CRM	96
1.7.11 Modelos celulares e animais das DCRM	98
2. Métodos	101
2.1 Avaliação clínica dos doentes e selecção de familiares	103
2.2 Isolamento de leucócitos de sangue periférico	103
2.3 Obtenção de fibroblastos em cultura a partir de biópsia de pele	104
2.4 Isolamento de mitocôndrias a partir de músculo esquelético obtido por biópsia	107
2.5 Obtenção de homogeneizados de tecido (músculos esquelético, cardíaco e fígado) colhido por biópsia, para estudos bioquímicos	108
2.6 Quantificação de proteína – Método de Bradford	109
2.7 Quantificação de proteína – Método de Lowry	110
2.8 Avaliação do consumo de oxigénio	111
2.9 Espectrofotometria de duplo comprimento de onda para avaliação da actividade dos complexos da CRM e de outras enzimas	114
2.9.1 Actividade da NQR	118
2.9.2 Actividade da NCCR	118
2.9.3 Actividade da SQDR e G3PDH	118
2.9.4 Actividade da SCCR, GPCCR e QCCR	119
2.9.5 Actividade da COX	120
2.9.6 Actividade da ATPase mitocondrial	121
2.9.7 Actividade da CS	121
2.9.8 Actividade da LDH	121
2.10 Extracção de DNA total	122
2.10.1 Extracção a partir de sangue periférico	123
2.10.2 Extracção a partir de fibroblastos em cultura	124
2.10.3 Extracção a partir de tecidos de biópsia/necrópsia	124
2.11 Quantificação de DNA	124
2.12 Análise de mutações no mtDNA	125
2.13 Purificação de Produtos de PCR	135

Índice de texto [*continuação*]

	Página
2.14 Análise de sequenciação	137
2.15 Análise estatística	139
3. Resultados e Discussão	141
3.1 Classificação de doentes e familiares	143
3.1.1 Classificação de doentes e familiares – Resultados	143
3.1.2 Classificação de doentes e familiares – Discussão	155
3.2 Análise molecular do mtDNA	157
3.2.1 Caracterização de amostras (mtDNA) – Resultados	157
3.2.2 Caracterização de amostras (mtDNA) – Discussão	168
3.2.3 Pesquisa de mutações do mtDNA – Resultados	170
3.2.4 Pesquisa de mutações do mtDNA – Discussão	217
3.3 Estudo bioquímico da CRM	226
3.3.1 Caracterização de amostras (CRM) – Resultados	226
3.3.2 Caracterização de amostras (CRM) – Discussão	237
3.3.3 Estabelecimento de valores controlo para a análise da CRM - Resultados	241
3.3.4 Estabelecimento de valores controlo para a análise da CRM – Discussão	241
3.3.5 Actividade da CRM nas amostras recebidas – Resultados	255
3.3.6 Actividade da CRM nas amostras recebidas – Discussão	256
3.3.7 Estabelecimento do critério de défice – Resultados	260
3.3.8 Estabelecimento do critério de défice – Discussão	263
3.3.9 Análise dos parâmetros da CRM nas amostras estudadas – Resultados	265
3.3.10 Análise dos parâmetros da CRM nas amostras estudadas – Discussão	286
3.3.11 Análise da CRM em LEU - Resultados	293
3.3.12 Análise da CRM em LEU - Discussão	300
3.3.13 Análise da CRM em FIB - Resultados	304
3.3.14 Análise da CRM em FIB - Discussão	311
3.3.15 Análise da CRM em mitocôndrias isoladas de MIT - Resultados	314
3.3.16 Análise da CRM em mitocôndrias isoladas de MIT - Discussão	322
3.3.17 Análise da CRM em homogeneizado de HM2 - Resultados	325
3.3.18 Análise da CRM em homogeneizado de HM2 - Discussão	333
3.3.19 Análise da CRM em homogeneizado de FIG - Resultados	336
3.3.20 Análise da CRM em homogeneizado de FIG - Discussão	342
3.3.21 Análise da CRM em homogeneizado de MIOC - Resultados	346
3.3.22 Análise da CRM em homogeneizado de MIOC - Discussão	347
3.3.23 Análise da CRM: estudo comparativo em LEU <i>vs.</i> outro(s) tecido(s) - Resultados	349

Índice de texto [*continuação*]

	Página
3.3.24 Análise da CRM: estudo comparativo em LEU vs. outro(s) tecido(s) - Discussão	350
3.3.25 Análise da CRM: estudo comparativo em MIT vs. HM2 - Resultados	351
3.3.26 Análise da CRM: estudo comparativo em MIT vs. HM2 - Discussão	351
3.3.27 Análise da CRM em fracções obtidas durante o isolamento de mitocôndrias de biópsia muscular - Resultados	352
3.3.28 Análise da CRM em fracções obtidas durante o isolamento de mitocôndrias de biópsia muscular - Discussão	357
3.3.29 Análise da CRM em homogeneizados de MUSC: fresco (HM1) vs. congelado (HM2)- Resultados	358
3.3.30 Análise da CRM em homogeneizados de MUSC: fresco (HM1) vs. congelado (HM2)- Discussão	361
3.3.31 Análise da CRM em homogeneizados de músculo de diferentes regiões - Resultados	361
3.3.32 Análise da CRM em homogeneizados de músculo de diferentes regiões - Discussão	364
3.3.33 Análise dos resultados de consumo de oxigénio, actividades enzimáticas de LDH, GPDH e GPCCR e integridade das membranas mitocondriais interna (I m.i.m.) e externa (I m.e.m.) - Resultados	365
3.3.34 Análise dos resultados de consumo de oxigénio, actividades enzimáticas de LDH, GPDH e GPCCR e integridade das membranas mitocondriais interna e externa - Discussão	370
3.3.35 Análise da variação da actividade dos complexos enzimáticos da CRM em relação à idade - Resultados	372
3.3.36 Análise da variação da actividade dos complexos enzimáticos da CRM em relação à idade - Discussão	374
3.4 Estudo comparativo dos sujeitos com alterações do mtDNA	375
3.4.1 Estudo comparativo dos sujeitos com alterações do mtDNA - Resultados	387
3.4.2 Estudo comparativo dos sujeitos com alterações do mtDNA - Discussão	388
3.5. Notas finais	392
3.6. Sugestões de trabalho futuro	402
4. Referências bibliográficas	405

Objectivos

Foram nossos objectivos ao longo do trabalho realizado, que culminou nesta Dissertação:

1- Elaborar um documento, em língua Portuguesa, com informação actualizada e a mais completa possível, sobre as doenças da cadeia respiratória mitocondrial, que possa ser útil, tanto a investigadores das Ciências Básicas, como a Clínicos interessados nesta área de estudos.

2- Compilar um anexo contendo informação detalhada sobre a nomenclatura de doenças e dos genes mitocondriais, entre outros, com vista ao seu futuro uso, tanto por clínicos, como investigadores, na investigação das DCRM, como documento de consulta.

3- Analisar, com base no rastreio bioquímico e genético da CRM, uma população de indivíduos que incluísse uma amostra de adultos e outra de crianças, com suspeita de DCRM.

4- Avaliar as alterações bioquímicas e moleculares encontradas e correlacionar os dados obtidos.

5- Estimar a prevalência (frequência) de DCRM nos casos estudados, tendo em conta a presença de alterações do mtDNA.

6- Discutir a diversidade de critérios aplicados, relativamente às actividades enzimáticas da CRM, nos diversos laboratórios de referência e elaborar uma tentativa de racionalização e proposta de um critério uniforme para definir “défice da CRM” no diagnóstico de DCRM.