

ANDRESA DE SANTI RODRIGUES

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MITOCONDRIAL CI-39kDa NA
IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS MITOCONDRIAIS ASSOCIADAS A
DEFEITOS DO COMPLEXO I**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista
de Medicina - para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2005

ANDRESA DE SANTI RODRIGUES

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MITOCONDRIAL CI-39kDa NA
IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS MITOCONDRIAIS ASSOCIADAS A
DEFEITOS DO COMPLEXO I**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista
de Medicina - para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Célia Harumi Tengan

SÃO PAULO

2005

FICHA CATALOGRÁFICA - BIBLAC

De Santi-Rodrigues, Andresa

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MITOCONDRIAL CI-39kDa
NA IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS MITOCONDRIAIS
ASSOCIADAS A DEFEITOS DO COMPLEXO I** / Andresa De
Santi Rodrigues – São Paulo, 2005.

81 p., xix

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo –
Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em
Neurologia.

Título em inglês: The expression of mitochondrial protein CI-
39kDa in the identification of mitochondrial diseases associates
with complex I disorders.

Palavras-chave: Complexo I / Cadeia respiratória / mitocôndria

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA

Chefe do Departamento: Prof^a. Dra. Débora Amado

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro

ANDRESA DE SANTI RODRIGUES

**A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MITOCONDRIAL CI-39kDa NA
IDENTIFICAÇÃO DE DOENÇAS MITOCONDRIAIS ASSOCIADAS A
DEFEITOS DO COMPLEXO I**

BANCA EXAMINADORA

Titulares

Prof^ª. Dra. Beatriz Hitomi Kiyomoto

Prof^ª. Dra. Leny Toma

Prof^ª. Dra. Iscia T. Lopes Cendes

Suplente

Prof^º. Dr. Mário Henrique de Barros

Aprovada em:/...../.....

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Neurobiologia Molecular da Disciplina de Neurologia Clínica - Departamento de Neurologia/Neurocirurgia – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, durante o curso de pós-graduação em Neurologia/Neurociências, com auxílio financeiro das entidades: CAPES, CNPq E FAPESP. O autor foi bolsista da CAPES.

Dedico esta tese com carinho
Aos meus pais, Marilza e Pedro, e às minhas irmãs, Andréa e Ariane, pelo
apoio, paciência e torcida.

Ao meu noivo, *Luciano*,
pelo amor, compreensão e incentivo dados nesta importante etapa da
minha vida.

*"Algo só é impossível até que alguém
duvide e prove o contrário".*

(A.Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Profª Dra. Célia Harumi Tengan, pela oportunidade, confiança e orientação deste trabalho.

À Profª Dra. Beatriz Hitomi Kiyomoto, pela colaboração e ensinamentos no dia-a-dia no laboratório.

Ao Prof. Dr. Acary Souza Bulle Oliveira, chefe do Setor.

Ao Prof. Dr. Beny Schmidt, responsável pelas biópsias musculares.

Às minhas amigas do laboratório, Cláudia, Juliana, Carina, Luana, Vanderli e Karine, pela amizade, ensinamentos, críticas e sugestões para a realização deste trabalho, e também claro, pelos momentos de descontração necessários.

Ao pessoal da Neuro-Experimental pela colaboração.

Ao Sr. Marco Aurélio Gonzaga, pela ajuda na parte burocrática.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e pelos auxílios financeiros recebidos para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	
vi	
AGRADECIMENTOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
RESUMO	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL	13
3.1. DROGAS E REAGENTES.....	13
3.2. EQUIPAMENTOS.....	13
3.3. AMOSTRAS.....	14
3.4. ASPECTOS ÉTICOS.....	18
4. MÉTODOS	20
4.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CI-39kDa POR <i>WESTERN</i> <i>BLOTTING</i>	20
4.1.1. Obtenção do homogeneizado do tecido.....	20
4.1.2. Quantificação de proteína total.....	21
4.1.3. <i>Western blotting</i>	21

4.1.4. Determinação da quantidade e condições ideais dos anticorpos primários para o estudo das proteínas específicas e anticorpo secundário utilizado.....	22
4.1.5. Análise dos resultados.....	25
4.2. Pesquisa de mutações em genes mitocondriais.....	25
4.2.1. Extração de DNA.....	26
4.2.2. Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de genes mitocondriais.....	26
4.2.3. Seqüenciamento de genes candidatos.....	30
4.2.4. Análise das seqüências.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CI-39KDA E SDH-Fp POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	33
5.1.1. Expressão de CI-39kDa no grupo controle.....	33
5.1.2. Expressão de CI-39kDa no grupo de pacientes.....	36
5.1.2.1. Análise da expressão de SDH-Fp no paciente 55.....	42
5.2. PESQUISA DE MUTAÇÕES EM GENES MITOCONDRIAIS.....	44
5.2.1. Genes codificadores para subunidades do complexo I	44
5.2.2. Gene <i>SDHA</i> codificador da subunidade flavoproteína do Complexo II.....	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	62

8. REFERÊNCIAS	63
9. ANEXOS	78
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	78
Anexo 2 – Resumo do caso do paciente nº 55	81
Anexo 3 – Resumo do caso do paciente nº 51	82

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
COX	Citocromo c oxidase
DNAmt	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
DNAn	Ácido desoxirribonucléico nuclear
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FP	Flavoproteína
HP	Proteína hidrofóbica
IP	Proteína ferro
KDa	Kilodawtons
LHON	Neuropatia óptica hereditária de Leber
MELAS	Encefalomiopatia mitocondrial associada à acidose láctica e acidentes vasculares
MERRF	Epilepsia mioclônica associada a <i>ragged red fibers</i>
MILS	Síndrome de Leigh
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NARP	Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa

xiii

ND	NADH desidrogenase
OEPC	Oftalmoplegia externa crônica progressiva
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SDH	Succinato desidrogenase
SKS	Síndrome de Kearns-Sayre
SP	Síndrome de Pearson
tRNA	Ácido ribonucléico transportador

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mutações em genes do complexo I, codificados pelo DNAn.	10
Tabela 2: Principais características clínicas e alterações observadas à biópsia muscular do grupo de pacientes.....	16
Tabela 3: Principais características clínicas e alterações observadas à biópsia muscular do grupo de controles.....	19
Tabela 4: Condições das reações de PCR	28
Tabela 5: <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos genes estudados	29
Tabela 6: Expressão de CI-39kDa em relação à expressão de SDH-Fp no grupo controle.....	34
Tabela 7: Expressão de CI-39kDa em relação à expressão de SDH-Fp no grupo de pacientes.....	37
Tabela 8: Expressão de CI-39kDa separados quanto ao diagnóstico (improvável, possível e provável) juntamente com o grupo controle.....	38
Tabela 9: Alterações encontradas pelo seqüenciamento dos genes para subunidades do complexo I, codificados pelo DNAm _t , no paciente nº 55.....	45

Tabela 10: Alterações encontradas pelo seqüenciamento dos genes para subunidades do complexo I, codificados pelo DNAn, no paciente nº 55.....	46
Tabela 11: Alterações encontradas pelo seqüenciamento do gene para a subunidade flavoproteína do complexo II, codificado pelo DNAn, no paciente nº 55.....	47
Tabela 12: Alterações encontradas pelo seqüenciamento dos genes para subunidades do complexo I, codificados pelo DNAm ^t , no paciente nº 51.....	48
Tabela 13: Alterações encontradas pelo seqüenciamento dos genes para subunidades do complexo I, codificados pelo DNAn, no paciente nº 51.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Determinação da quantidade ideal de proteína total e o tempo de exposição ideal para quantificação.....	24
Figura 2: Análise da influência da idade sobre a expressão de CI-39kDa/SDH-Fp do grupo controle.....	35
Figura 3: Variação dos resultados obtidos em relação ao grupo diagnóstico.....	39
Figura 4: Resultados obtidos do grupo controle e do grupo de paciente	40
Figura 5: <i>Western blotting</i> para SDH-Fp e CI-39 kDa.....	41
Figura 6: Expressão de SDH-Fp, CI-39kDa e porina	43
Figuras 7: Análise da seqüência do éxon 2 de <i>NDUFV2</i> do paciente nº 51.....	49
Figura 8: Análise da seqüência do éxon 12 de <i>SDHA</i> do paciente nº 55.....	52

RESUMO

As doenças mitocondriais são o resultado de mutações herdadas ou espontâneas do DNA mitocondrial (DNAMt) ou DNA nuclear (DNAn) levando à função anormal do sistema de fosforilação oxidativa. Um dos defeitos no DNAn mais frequentemente descritos neste grupo de doenças são as deficiências isoladas do Complexo I, que é o maior complexo enzimático da cadeia respiratória com 42 subunidades (7 codificadas pelo DNAMt). Propõe-se que a subunidade de 39kDa (CI-39kDa) apresente estreita correlação com a atividade enzimática do complexo I. Sendo assim, poderíamos interrogar se a diminuição da expressão de CI-39kDa, detectada por *Western blotting*, poderia ser utilizada como um método diagnóstico para as deficiências do Complexo I, além deste método ter como vantagem a utilização de pequena porção de tecido congelado obtido por biópsia. Este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência da diminuição da proteína mitocondrial CI-39kDa no músculo esquelético de pacientes com suspeita de doença mitocondrial, e verificar se mutações conhecidas em genes codificadores de subunidades do Complexo I estariam associadas à diminuição da expressão desta proteína. As proteínas foram obtidas através do lisado de músculo esquelético de 56 pacientes e 21 controles.

As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante, transferidas para membrana PVDF, que foi incubada com um anticorpo anti-CI-39kDa e SDH-Fp (succinato desidrogenase-fração flavoproteína). As bandas foram obtidas por autoradiografia e quantificadas por densitometria. A diminuição da expressão da proteína CI-39kDa, encontrada nos casos com diagnóstico possível e provável para doença mitocondrial, foi de 6%. O estudo por seqüenciamento mostrou somente uma alteração suspeita: mutação de sentido ainda não descrita em *NDUFV2*. Nossos resultados mostraram que: (1) a freqüência da diminuição da expressão de CI-39kDa foi baixa nos casos estudados com suspeita de doença mitocondrial; (2) a avaliação molecular desses casos mostrou que mutações em genes codificados pelo DNAm, e mutações conhecidas em genes nucleares para subunidades do complexo I, não foram a causa do defeito destes pacientes; (3) a alteração de *NDUFV2* pode ser a causa de uma disfunção do complexo I, a qual deverá ser melhor investigada para confirmar a sua patogenicidade. A ampliação deste estudo poderá confirmar a utilidade deste método para o diagnóstico das deficiências do Complexo I.

1. INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas intracitoplasmáticas, cuja principal função é a de prover energia à célula através do processo de fosforilação oxidativa. Estima-se que mais de 90% do ATP necessário aos diversos propósitos biológicos seja produzido por essa organela.

A mitocôndria é formada por quatro compartimentos: a membrana externa, membrana interna, espaço intermembrana e matriz. Na matriz mitocondrial ocorrem as principais atividades metabólicas da mitocôndria como o ciclo do ácido cítrico, a oxidação dos ácidos graxos e a síntese de ATP. A membrana interna apresenta invaginações ou cristas contendo o complexo enzimático (Complexo V) responsável pela síntese de ATP (ATP sintetase) e os componentes da cadeia respiratória, composta por quatro complexos enzimáticos transportadores de elétrons: Complexo I (NADH ubiquinona redutase), Complexo II (succinato ubiquinona redutase), Complexo III (ubiquinona citocromo c oxidoreductase) e o Complexo IV (citocromo c oxidase), juntamente com dois transportadores de elétrons móveis – coenzima Q10 (ubiquinona) e citocromo c. Estes cinco complexos, formam o sistema de fosforilação oxidativa (Wallace, 1994; Hatefi, 1985; Schagger & Pfeiffer, 2000).

O processo de fosforilação oxidativa ocorre da seguinte maneira: a passagem de elétrons pelos complexos respiratórios é acoplada com a síntese de ATP ; NADH e FADH₂, produzidos durante a glicólise e o ciclo de Krebs, doam elétrons para os Complexos I e II, respectivamente, iniciando a cadeia de transporte de elétrons. Conforme os complexos respiratórios doam os elétrons para o receptor seguinte, libera-se energia que é utilizada para o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana. A alta concentração de prótons leva à criação de um gradiente eletroquímico, o qual é utilizado pela enzima ATP sintetase para a formação de ATP. Ao final da cadeia, os elétrons são transportados para o Complexo IV o qual transfere elétrons para o oxigênio molecular, que é o aceptor final (Saraste, 1999).

As mitocôndrias apresentam características especiais, pois são as únicas organelas que possuem o seu próprio material genético, o DNA mitocondrial (DNAMt). Cada célula contém centenas de mitocôndrias e cada uma delas pode conter de dois a dez genomas mitocondriais (Bogenhagen & Clayton, 1974; Oliver & Wallace, 1982; Satoh & Kuroiwa, 1991). O genoma mitocondrial humano é uma molécula circular fechada, dupla fita, composta por 16.569 pares de bases e sua seqüência nucleotídica completa foi determinada por Anderson *et al.* (1981). É composta por duas cadeias: a cadeia pesada H, rica em purinas (adenina e guanina) e a cadeia leve L, rica em pirimidinas (citosina e timina) (Clayton, 1991). O DNAMt tem duas origens distintas de replicação, uma para cada cadeia, separadas por uma distância que corresponde a 2/3 do genoma: a origem de replicação para a cadeia pesada (OH) localiza-se na região D-loop

(Clayton, 1982) e, a origem de replicação para a cadeia leve (OL), localiza-se entre os nucleotídeos 5721-5781, dentro de uma região codificadora para 5 tRNAs (Clayton, 1992).

Para que a mitocôndria seja formada e exerça todas as suas funções, são necessários cerca de 3000 genes, provenientes tanto do DNA mitocondrial (DNAMt) como do DNA nuclear (DNAn). O sistema de fosforilação oxidativa utiliza os produtos de aproximadamente 60 genes nucleares e 13 genes mitocondriais para produzir ATP celular (Smeitink & Heuvel, 1999). A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo núcleo, sintetizadas no citoribossomo e importadas para dentro da mitocôndria. O DNAn é responsável pela síntese de proteínas que terão funções diversas na mitocôndria, até o controle da replicação e transcrição do DNAMt. Sendo assim, o funcionamento perfeito da mitocôndria depende da interação adequada dos dois genomas. Menos de 10% das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNAMt. O complexo II da cadeia respiratória é o único que apresenta todas as suas subunidades codificadas pelo DNA nuclear. Em mamíferos, o DNAMt codifica 13 proteínas, sete constituindo parte do Complexo I (NADH desidrogenase ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6), uma no Complexo III (citocromo *b*), três no Complexo IV (COI, II e III) e duas no Complexo V (A6, A6L) (DiMauro & Schapira, 1994). Além disso, o DNAMt codifica também 2 rRNAs (12S e 16S) e 22 tRNAs necessários para a síntese desses 13 polipeptídeos (Anderson *et al.*, 1981).

Tanto o DNAn quanto o DNAMt codificam para o sistema de fosforilação oxidativa. A transcrição, tradução, modificação pós-traducional, importação, montagem e

funcionamento destes complexos são processos altamente complexos (Smeitink *et al.*, 2001a).

As mitocôndrias são mais abundantes em tecidos com alta demanda oxidativa como cérebro, músculo cardíaco e esquelético. Esses tecidos são predominantemente afetados nas doenças mitocondriais e são caracterizados por alterações na atividade dos complexos respiratórios. A coexistência de dois tipos de populações de DNAm (DNAm normal ou selvagem e DNAm mutado) em células ou tecidos de um paciente, mostra uma condição denominada heteroplasmia. O fenótipo de uma doença mitocondrial geralmente é manifestado quando a quantidade de DNAm mutante está acima do limite tolerado pela célula para manter sua atividade metabólica normal. À medida que aumenta o número de moléculas de DNAm mutantes, ocorre um declínio de energia celular, e as células ou tecidos passam a não funcionar normalmente (DiMauro & Schon, 2001).

Apesar de se acreditar que, diferentemente do DNAn, o DNAm humano é transmitido somente por herança materna, ao longo das gerações (Taanman, 1999) existe a proposição de herança paterna do DNAm. Esta proposição foi documentada em um único indivíduo, um paciente com miopatia com RRF (*ragged red fibers*) e deficiências dos complexos I e IV causada por uma microdeleção no gene *ND2*. No músculo deste paciente, a maioria do DNAm (não a troca patogênica) foi herdada do pai (Schwartz & Vissing, 2002). Este, no entanto, parece ser uma exceção, pois três estudos posteriores não confirmaram a presença de DNA paternal no músculo de muitos outros pacientes com

miopatias causadas por mutações no DNAMt (Taylor *et al.*, 2003; Filosto *et al.*, 2003; Schwartz & Vissing, 2004). Por outro lado, a coexistência de DNAMt de origens materna e paterna em músculo de somente um paciente, forneceu um experimento mostrando que moléculas de DNAMt podem, e se recombinaem (Kraytsberg *et al.*, 2004).

AS DOENÇAS MITOCONDRIAIS SÃO O RESULTADO DE MUTAÇÕES HERDADAS OU ESPONTÂNEAS DO DNAMT OU DNAN, LEVANDO À FUNÇÃO ANORMAL DO SISTEMA DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA. MUTAÇÕES NO DNAN RESULTAM EM DEFICIÊNCIAS DA FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA INCLUINDO MUTAÇÕES EM GENES ESTRUTURAIS DO COMPLEXO I E II, BEM COMO MUTAÇÕES RESULTANDO EM ERROS NA COMUNICAÇÃO INTERGENÔMICA, MONTAGEM DO SISTEMA DE FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA, HOMEOSTASE E IMPORTAÇÃO (SMEITINK ET AL., 2001A). SEGUNDO A ÚLTIMA CLASSIFICAÇÃO DAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS, PODEMOS TER AQUELAS CAUSADAS POR DEFEITOS EM GENES CODIFICADOS PELO DNAN: (1) DEFEITOS EM SUBUNIDADES DA CADEIA RESPIRATÓRIA; (2) DEFEITOS EM PROTEÍNAS AUXILIARES; (3) DEFEITO NA SINALIZAÇÃO INTERGENÔMICA; (4) DEFEITOS NO “LIPID MILIEU”; (4) DEFEITOS EM MOTILIDADE/FUSÃO/FISSÃO. JÁ OS DEFEITOS NO DNAMT PODEM SER DIVIDIDOS EM: MUTAÇÕES EM GENES QUE SINTETIZAM PROTEÍNAS (TRNA, RRNA, REARRANJOS) E MUTAÇÕES EM GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS (MULTISISTÊMICO, TECIDO-ESPECÍFICO) (DIMAURO, 2004; DIMAURO & HIRANO, 2005). O NÚMERO

DE MUTAÇÕES DE PONTO DO DNAMT DOCUMENTADAS INCLUEM MAIS DE 118, ALÉM DE NUMEROSOS REARRANJOS RELATADOS (DIMAURO & SCHON, 2001). MUTAÇÕES DELETÉRIAS EM GENES MITOCONDRIAIS OCORREM MUITO MAIS FREQUENTEMENTE DO QUE EM GENES NUCLEARES, ISTO PORQUE O DNAMT NÃO TEM MECANISMO DE REPARO (WALKER, 1992). APROXIMADAMENTE 38% DO GENOMA MITOCONDRIAL, É CODIFICADO POR COMPONENTES DO COMPLEXO I, E DEFEITOS QUE SURGEM DAS ENZIMAS DESTE COMPLEXO SÃO OS MAIS COMUNS (WALKER, 1992). AS DEFICIÊNCIAS DESTE COMPLEXO RESULTAM EM UM ESPECTRO EXTRAORDINARIAMENTE GRANDE DE APRESENTAÇÕES CLÍNICAS, E O DIAGNÓSTICO É REALIZADO ATRAVÉS DA COMBINAÇÃO DE INVESTIGAÇÕES CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS E GENÉTICAS (MUNNICH & RUSTIN, 2001; SMEITINK *ET AL.*, 2001B).

Diversas mutações no DNAMt têm sido descritas em associação com encefalomiopatias ou outras doenças neurológicas (Wallace, 1992). As deleções ou duplicações esporádicas do DNAMt são geralmente encontradas em pacientes com oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP), Síndrome de Kearns-Sayre (SKS) (Moraes *et al.*, 1989), e em pacientes apresentando Síndrome de Pearson (SP) (Rötig *et al.*, 1990). Já as doenças causadas por mutações de ponto no DNAMt podem levar a fenótipos bastante variados como: miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios semelhantes a acidentes vasculares cerebrais (MELAS) (Goto *et al.*, 1990); epilepsia mioclônica com fibras ragged-red (MERRF) (Shoffner *et al.*, 1990); neuropatia óptica

hereditária de Leber (LHON) (Riordan-Eva & Harding, 1995); Síndrome de Leigh (MILS) (Shoffner *et al.*, 1992) juntamente com neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa (NARP) (Holt *et al.*, 1990).

Mutações no DNAm são usualmente encontradas somente em uma proporção em moléculas de DNAm (heteroplasmia); esta proporção pode variar nos diferentes tecidos e determinar a expressão fenotípica no paciente (Bentlage *et al.*, 1995).

Em 1995, a primeira mutação em um gene nuclear causando uma doença mitocondrial foi descrita no gene para succinato desidrogenase (*SDH*), levando a um quadro de Síndrome de Leigh, encefalopatia progressiva infantil com degeneração em núcleos da base e tronco cerebral (Bourgeron *et al.*, 1995). A partir disso, o interesse da genética mitocondrial se voltou para a importância do estudo dos genes nucleares nas doenças mitocondriais.

A maioria dos pacientes com defeitos em genes nucleares são crianças que apresentam encefalopatia com evolução progressiva ou fatal. Os defeitos mais frequentemente descritos neste grupo de doenças são as deficiências isoladas do Complexo I (Morris *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 1996; Loeffen *et al.*, 2000; Smeitink *et al.*, 2001a; Robinson, 1998). As deficiências do Complexo I, nas doenças mitocondriais, têm uma incidência estimada de 1:10000 nascidos vivos (Zeviani *et al.*, 1998; Smeitink *et al.*, 2001a; Loeffen *et al.*, 2000; Robinson, 1998).

O complexo I, ou NADH: ubiquinona oxidoreductase, com uma massa molecular de 900 kDa, representa o maior e primeiro complexo mediador da

transferência de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial. A função geral deste complexo é passar elétrons do NADH para a ubiquinona, enquanto íons hidrogênio são bombeados de fora da matriz mitocondrial para dentro do espaço intermembrana. Este complexo contém uma configuração na forma de “L” com um braço periférico solúvel em água projetando-se para dentro da matriz mitocondrial e um braço hidrofóbico (insolúvel em água) encaixado na membrana mitocondrial interna. Este complexo é composto por pelo menos 43 subunidades diferentes nas quais 7 são codificadas pelo genoma mitocondrial (*ND1-6, ND4L*) e o restante são codificadas por genes nucleares (Loeffen *et al.*, 2000). Ainda pode ser dividido em 3 frações diferentes: tanto a fração flavoproteína (FP), como a fração da proteína ferro-enxofre (IP) representam o braço periférico, enquanto que a fração da proteína hidrofóbica (HP) representa o braço, insolúvel em água, agregado na membrana mitocondrial interna. A fração FP contém 3 subunidades (*NDUFV1 NDUFV2, NDUFV3*), a fração IP contém 7 subunidades (*NDUFA5, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6*), e a fração HP contém, no mínimo, 24 subunidades codificadas pelo genoma nuclear e 6 subunidades codificadas pelo genoma mitocondrial (Triepels *et al.*, 2001b). A localização exata da subunidade de 17,2 kDa, codificada pelo genoma nuclear, e da subunidade *ND6*, codificada pelo genoma mitocondrial, ainda não são conhecidas no complexo (Sazanov *et al.*, 2000).

As conseqüências bioquímicas das deficiências do sistema de fosforilação oxidativa incluem o interrompimento do potencial de membrana, alteração da proporção de

ATP/ADP, troca de íons na homeostase e aumento na produção de radicais livres (Westhuizen *et al.*, 2003).

Síndrome de Leigh (Leigh, 1951) ou doença “Leigh-like” são os fenótipos mais comuns associados com a deficiência isolada do complexo I, representando mais de 50% do total dos casos (Morris *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 1996; Robinson, 1998; Loeffen *et al.*, 2000). Outros fenótipos geralmente observados são cardiomiopatia (~ 11%), acidose láctica fatal infantil (~ 11%), macrocefalia com leucodistrofia progressiva (~ 7%) e encefalopatia inespecífica (~ 21%) (Loeffen *et al.*, 2000). A tabela 1 mostra as mutações em genes codificados pelo DNAn do complexo I descritas até o momento.

A nível celular, defeitos no complexo I podem afetar a oxidação de NADH levando à um excesso de NADH e falta de NAD⁺ na célula. Isto levará a um funcionamento prejudicial no ciclo de Krebs tendo como consequência a elevação de lactato no sangue (~ 85%) e um aumento de corpos cetônicos e proporção de lactato/piruvato (Munnich *et al.*, 1992). Embora concentrações normais de lactato, piruvato e corpos cetônicos não excluam definitivamente distúrbios mitocondriais (DiMauro *et al.*, 1999; Triepels *et al.*, 1999).

As deficiências do complexo I têm sido descritas de forma crescente na literatura nos últimos anos. Fala-se que estas deficiências seriam as principais causas de encefalopatia mitocondrial infantil (Morris *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 1996; Loeffen *et al.*, 2000; Smeitink *et al.*, 2001a; Robinson, 1998). No Brasil, ainda não sabemos a freqüência desta deficiência em nossos pacientes e uma das dificuldades para se saber isto, é a dificuldade de diagnóstico. Uma maneira de se fazer o diagnóstico é pela dosagem bioquímica da atividade do complexo I

em músculo de biópsia ou fibroblastos (Triepels *et al.*, 2001b), no entanto, a dosagem bioquímica não é realizada rotineiramente na maioria dos serviços no Brasil. Problemas no diagnóstico bioquímico de defeitos enzimáticos da cadeia

Tabela 1: Mutações em genes do complexo I, codificados pelo DNAn.

Gene	Alterações descritas	Referência	
<i>NDUFS4</i>	W15X R106X IVS1-1G>A	Petruzzela <i>et al.</i> , 2001 Budde <i>et al.</i> , 2000 Benit <i>et al.</i> , 2003(b) Budde <i>et al.</i> , 2000	
	X97fs S158fsX192	Heuvel <i>et al.</i> , 1998	
<i>NDUFS8</i>	P79L R102H	Loeffen <i>et al.</i> , 1998 Loeffen <i>et al.</i> , 1998	
	<i>NDUFV1</i>	R59X	Schuelke <i>et al.</i> , 1999
Y204C		Benit <i>et al.</i> , 2001	
C206G		Benit <i>et al.</i> , 2001	
A211V		Schuelke <i>et al.</i> , 2002	
E214K		Benit <i>et al.</i> , 2001	
A341V		Schuelke <i>et al.</i> , 1999	
T423M		Schuelke <i>et al.</i> , 1999	
A432P		Benit <i>et al.</i> , 2001	
C330fsX332		Benit <i>et al.</i> , 2001	
X332fs		Benit <i>et al.</i> , 2001	
<i>NDUFV2</i>	A29V IVS2+5_+8delGTAA	Hattori <i>et al.</i> , 1998 Benit <i>et al.</i> , 2003(a)	
	<i>NDUFS1</i>	R241W	Benit <i>et al.</i> , 2001
D252G		Benit <i>et al.</i> , 2001	
R557X		Benit <i>et al.</i> , 2001	
M707V		Benit <i>et al.</i> , 2001	
K222del		Benit <i>et al.</i> , 2001	
<i>NDUFS2</i>	R228Q P229Q S413P	Loeffen <i>et al.</i> , 1998 Loeffen <i>et al.</i> , 1998 Loeffen <i>et al.</i> , 1998	
	<i>NDUFS7</i>	V122M	Triepels <i>et al.</i> , 1999

Adaptado: The Human Gene Mutation Database
(<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd/search.html>)

respiratória têm sido relatados (Trijbels *et al.*, 1993; Thorburn, 2000; Thorburn & Smeitink, 2001; Munnich & Rustin, 2001). Nestes problemas incluem-se a especificidade do tecido, dificuldades em definir os intervalos de valores normais de forma realística, incapacidade de ensaios enzimáticos para detectar alguns defeitos funcionais, variação em protocolos de ensaio, falta de um critério de diagnóstico muito aceitável e um esquema de garantia de qualidade (Thorburn *et al.*, 2004). Além disso, a investigação bioquímica é, de preferência, realizada em homogenizados de tecido muscular frescos, pois o congelamento pode destruir a membrana mitocondrial e a integridade da cadeia respiratória será perdida. No caso de tecidos congelados, as taxas da oxidação do substrato e a produção de ATP não podem ser medidas (Triepels *et al.*, 2001b).

Um estudo analisando 11 linhagens de células de pacientes com comprovada deficiência isolada do complexo I, através do método de *Western blotting*, mostrou que apesar de apresentarem mutações em genes codificando outras subunidades (*NDUFVI*, *NDUFS4*, *NDUFS2*, *NDUFS7* e *NDUFS8*), existia uma boa correlação entre a expressão de CI-39kDa e a atividade do complexo I (Triepels *et al.*, 2001a). Tomando como base esses dados, poderíamos interrogar se a diminuição da expressão de CI-39kDa, detectada por *Western blotting*, poderia ser utilizada como um método diagnóstico para as deficiências do Complexo I. Este método teria como vantagem, a utilização de pequena porção de tecido congelado obtido por biópsia.

2. OBJETIVOS

Avaliar a frequência da diminuição da expressão da proteína mitocondrial CI-39kDa no músculo esquelético de pacientes com suspeita de doença mitocondrial.

Verificar se mutações conhecidas em genes codificadores de subunidades do Complexo I estariam associadas à diminuição da expressão de CI-39kDa.

3. MATERIAL

3.1. DROGAS E REAGENTES

Dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), glicerol, acrilamida, persulfato de amônio, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamino (TEMED) e *coomassie brilliant blue* foram adquiridos da Gibco BRL; ácido etileno glicol-bis [β -aminoetil eter]-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), azul de bromofenol, *nitroblue tetrazolium* (NBT); diaminobenzidina (DAB); citocromo c de coração de cavalo tipo VI e catalase da Sigma; tris da Fisher Scientific; bisacrilamida, *amido black*, tweenTM-20 e ácido succínico da Amersham Biosciences; glicina da Bio-Rad; metanol, ácido acético glacial, etanol, cloreto de sódio e ácido clorídrico da Merck; ditioneitol (DTT) da Invitrogen Life Technologies; fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio bifásico (Na_2HPO_4) da Vetec.

3.2. EQUIPAMENTOS

Cuba vertical Mini-Protean[®] II para eletroforese (Bio-Rad); cuba para transferência (Bio-Rad); fontes Power Pac 300 (Bio-Rad); microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415C); fluorímetro (Bio-Rad Versa FluorTM Fluorometer);

termociclador (Gene Amp System 2400 – Perkin Elmer ®); agitador magnético/aquecedor (Cimarec®2 Thermolyne); banho-maria (Lab-Line Aquabath); balança analítica (Denver Instrument XE-100 e XL-3100); destilador (Barnstead Fistreem™ II); pHmetro (Denver Instrument Model 10); capela de exaustão (Nalgon); agitador orbital (Waterbath Shaker Model WB-10/SC Elmeco); transiluminador (Bio-Rad Mini-Transilluminator); Máquina fotográfica (Polaroid GelCam H34-EL); Cassete para revelação (Kodak BioMax).

3.3. AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de biópsia de músculo deltóide obtidas de dois grupos: (1) pacientes com suspeita de doença mitocondrial e (2) controles.

Pacientes: Foram estudadas as amostras de 56 pacientes encaminhados para a realização de biópsia de músculo, devido a uma suspeita de doença mitocondrial, e que tinham material disponível para a realização do estudo. Os dados clínicos e de exames subsidiários foram obtidos retrospectivamente dos prontuários médicos e relatórios de encaminhamento, sendo que as principais características destes pacientes estão resumidas na Tabela 2. Os pacientes foram classificados, segundo a probabilidade de diagnóstico de doença mitocondrial, em improvável, provável, possível e definitivo, de acordo com os critérios diagnósticos para doença mitocondrial de Wolf & Smeitink (2002).

Foram incluídos os seguintes grupos de pacientes:

1. pacientes com suspeita de doença mitocondrial, mas classificada como doença mitocondrial improvável;
2. pacientes com suspeita de doença mitocondrial classificada como possível, provável ou definitivo, e ausência das mutações de ponto A3243G, A8344G e T8993G/C;
3. pacientes com quadro de miopatia, presença de RRF com atividade normal para COX pela histoquímica muscular, mas sem alterações no DNAm (ausência de rearranjos e seqüenciamento do DNAm sem mutações patogênicas);
4. pacientes com quadro sugestivo de defeitos combinados na cadeia respiratória devido a defeitos em genes nucleares.

Foram excluídos os casos:

1. com padrão de biópsia muscular sugestivo de alterações no DNAm (presença de RRF associada a deficiência focal de COX) e sem investigação completa do DNAm;
2. com investigação molecular prévia mostrando a presença de rearranjos do DNAm;
3. com padrão de deficiência difusa de COX, pela histoquímica da biópsia muscular, sugestivo de defeitos em genes de montagem da COX.

Tabela 2: Principais características clínicas e alterações observadas à biópsia muscular do grupo de pacientes.

no.	Idade (anos)	Qu adr o Clí nic	PM	def.combinado		possibilidade DM
1	1	Encefalopatia	Não	Não		possível
2	6	Encefalopatia	Não	Não		possível
3	1	Encefalopatia	Não	Não		possível
4	11	Multisistêmico	Não	Não		possível
5	10	Encefalopatia	Não	Não		improvável
6	3	Encefalopatia	Não	Não		improvável
7	6	Miopatia	Não	Não		improvável
8	3	Miopatia	Não	Não		improvável
9	2	Encefalopatia	Não	Não		improvável
10	12	Multisistêmico	Não	Não		possível
11	7	Encefalopatia	Não	Não		improvável
12	4	Encefalopatia	Não	Não		improvável
13	9	Miopatia	Não		Impro vável	
14	9	Encefalopatia	Não	Não		Improvável
15	1	Encefalopatia	Não	Não		Improvável
16	2	Multisistêmico	Não	Não		Possível
17	22	Multisistêmico	Sim	Não		Provável
18	14	Encefalopatia	Não	Não		Improvável
19	3	Encefalopatia	Não	Não		Possível
20	25	Encefalopatia	Não	Não		Possível
21	8	Miopatia Ocular	Sim	Não		Provável
22	36	Multisistêmico	Não	Não		Possível
23	8	Miopatia Ocular	Sim	Não		Provável
24	2	Multisistêmico	Não	Não		Possível
25	13	Encefalopatia	Não	Não		Improvável

26	9	Miopatia	Não	Não	Improvável
27	5	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
28	<1	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
29	1	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
30	12	Miopatia Ocular	Sim	Não	Provável
31	15	Multisistêmico	Não	Não	Possível
32	1	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
33	28	Miopatia Ocular	Sim	Não	Provável
34	4	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
35	8	Multisistêmico	Não	Não	Possível
36	1	Miopatia	Não		Possível
37	1	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
38	1	Encefalopatia	Não		Provável
39	10	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
40	11	Multisistêmico	Não	Não	Possível
41	<1	Encefalopatia	Não	Não	Possível
42	1	Multisistêmico	Não	Não	Possível
43	1	encefalopatia	Não	Não	Provável
44	2	Encefalopatia	Não	Não	Provável
45	3	Encefalopatia	Não		Improvável
46	6	Miopatia	Não	Não	Improvável
47	19	Multisistêmico	Não	Não	Provável
48	8	Multisistêmico	Não	Não	Possível
49	3	Encefalopatia	Não	Não	Improvável
50	<1	Multisistêmico	Não	Não	Possível
51	1	Encefalopatia	Não	Não	Possível
52	48	Encefalopatia	Não	Não	Possível
53	5	Encefalopatia	Não	Não	Possível
54	4	Encefalopatia	Não	Não	Possível
55	27	Miopatia	Sim	Sim	Provável
56	1	Encefalopatia	Não	Não	Possível

PM= proliferação mitocondrial, DM= doença mitocondrial, Multisistêmico= comprometimento de dois ou mais sistemas.

Controles – Foram selecionadas 21 amostras de pacientes que foram submetidos à biópsia muscular para fins de diagnóstico, mas cujo laudo final era normal ou com alterações mínimas e não sugestivas de doença mitocondrial. Estes pacientes não tinham história sugestiva de doença mitocondrial ou tinham diagnóstico de outras doenças que não apresentam associação conhecida com alterações mitocondriais. (Tabela 3).

3.4. ASPECTOS ÉTICOS

Todas as amostras utilizadas foram obtidas exclusivamente para fins de diagnóstico. Este estudo é parte do projeto intitulado “IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS MUTAÇÕES EM GENES NUCLEARES ENVOLVIDOS NAS DOENÇAS MITOCONDRIAIS”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, sob o processo no. 0098/02 (Anexo 1).

Tabela 3: Principais características clínicas e alterações observadas à biópsia muscular do grupo de controles.

no.	Idade		Diagnóstico clínico	Biópsia muscular
	(anos)			
C1	11		Icam	Normal
C2	21		miastenia	Atrofia II c/ linforragia
C3	35		Paralisia Periódica	miopatia vacuolar sugestivo de PP
C4	61		miastenia	linforragia
C5	23		Paralisia Periódica	miopatia vacuolar sugestivo de PP
C6	21		vasculite	Amiotrofia neurogênica inespecífica
C7	28		Paralisia Periódica	Miopatia vacuolar sugestivo de PP
C8	4		miastenia	Amiotrofia neurogênica inespecífica
C9	ND		miastenia	linforragia
C10	ND		colagenose	Normal
C11	61		doença degenerativa	Amiotrofia neurogênica inespecífica
C12	38		Sarcoidose	Normal
C13	ND		LES	Normal
C14	37		LES	Normal
C15	63		polineuropatia periférica	Normal
C16	26		esclerose múltipla	amiotrofia neurogênica crônica inesp.
C17	55		amiotrofia esp. prog.	amiotrofia neurogênica crônica inesp.
C18	34		colagenose	Normal
C19	43		colagenose	Normal
C20	48		colagenose	Normal
C21	6		miastenia	Atrofia de fibras do tipo II e PI

LES = Lupus Eritematoso Sistêmico, ND= não disponível, PP= paralisia periódica, PI= predominância de fibras do tipo I, inesp.= inespecífica, esp.prog.= espinhal progressiva, Icam= lesão do corno anterior da medula.

4. MÉTODOS

Este estudo consistiu das seguintes etapas:

- 4.1. análise da expressão da proteína CI-39kDa por *Western blotting*
- 4.2. pesquisa de mutações em genes mitocondriais

4.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA CI-39kDa POR *WESTERN BLOTTING*

Este método permite a detecção de proteínas por procedimentos imunológicos, onde utiliza-se um anticorpo específico para a proteína de interesse e um anticorpo secundário (conjugado à peroxidase), que se liga ao anticorpo primário. A proteína específica é então detectada por autoradiografia através da emissão do sinal, após a reação de quimioluminescência com a peroxidase (Towbin *et al.*, 1979).

4.1.1. Obtenção do homogeneizado do tecido

As amostras foram homogeneizadas com solução tampão contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, Tris 63 mM pH 6.8, Glicerol 6% e DTT 50 mM. Estas foram fervidas por 2 minutos e, em seguida, centrifugadas por 10

minutos a 14000 rpm (rotações por minuto). O sobrenadante foi transferido para ser utilizado posteriormente.

4.1.2. Quantificação de proteína total

As proteínas foram quantificadas por fluorimetria, de acordo com as instruções do reagente *NanoOrange* (Molecular Probes). Resumidamente, o procedimento de quantificação foi o seguinte: 1µL de proteína das amostras foi diluído em componente B junto com o reagente *NanoOrange* (componenteA), diluído 500x. As proteínas foram desnaturadas a 93°C por 10 minutos e a leitura foi realizada após 20 minutos, em fluorímetro. A partir de leituras obtidas de amostras padrão, albumina bovina sérica (ABS), com quantidades de proteína conhecidas, obtivemos uma curva padrão, que foi utilizada para estimar a quantidade de proteína das amostras.

4.1.3. Western blotting

O gel de corrida 12% foi formado por acrilamida 30% (acrilamida: metil-bisacrilamida = 29:1), Tris 0,37 M pH 8.8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED. O “stacking gel” 5% foi formado por acrilamida 30%, Tris 0,12 M pH 6.8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED. As proteínas foram separadas a 80V por 30 minutos, e depois por 150V por, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos.

Após a eletroforese, foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana PVDF (*polyvinylidene difluoride*) 0.2 μ m *Sequi-Blot* (BioRad), a 350mA por 3 horas e 20 minutos. Em seguida, foi feito o bloqueio da membrana com uma solução de leite 5% em TBS-T (0,1% Tween™- 20 em Tris base 20 mM, cloreto de sódio 137 mM pH 7.6) por 1 hora a 4°C.

A membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em uma solução TBS-T e leite 1% por 1 hora e 20 minutos, a temperatura ambiente com leve agitação. Após esta etapa, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) por 1 hora e 20 minutos, a temperatura ambiente e com leve agitação. A detecção do sinal foi realizada utilizando-se os reagentes de detecção do sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.4. Determinação da quantidade e condições ideais dos anticorpos primários para o estudo das proteínas específicas e anticorpo secundário utilizado

Após testarmos diferentes concentrações dos anticorpos, obtivemos as seguintes concentrações ideais: 1,2 μ g/mL para Anti-CI-39kDa (Molecular Probes) e 0,15 μ g/mL para anti-SDH-Fp 70kDa (Molecular Probes).

O anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse, na diluição de 1:10000 (já padronizada pelo nosso laboratório), proveniente do sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Para determinarmos a quantidade ideal de proteína a ser utilizada para o nosso estudo, realizamos um experimento utilizando uma amostra controle com diferentes

quantidades de proteína (1, 5, 10, 15 e 20 μg). Assim, observamos que com a quantidade de 10 μg , a banda obtida apresentava o sinal ainda na fase linear do gráfico correlacionando intensidade da banda e quantidade de proteína (Figura 1).

Foram obtidas auto-radiografias em diferentes tempos de exposição (2, 5, 10 e 15 minutos). Assim, determinamos que a melhor exposição para a análise das bandas era a de 5 minutos, pois não havia saturação das bandas.

4.1.5. Análise dos resultados

As bandas não saturadas foram quantificadas por escaneamento e análise densitométrica, utilizando-se o programa NIH Image 1.61. A expressão de CI-39kDa foi avaliada em relação à expressão de SDH-Fp (CI-39kDa/SDH-Fp), para correção quanto ao conteúdo mitocondrial.

Foi realizada uma normalização dos resultados como fator de correção, obtida de acordo com (Conrad *et al.*, 2001), onde é escolhida uma amostra referência em cada um dos géis, e esta é comparada entre os diferentes géis. Com a normalização corrigimos eventuais diferenças na quantificação, decorrente de diferenças na reação de quimioluminescência nos diferentes géis.

Após a normalização, consideramos expressão diminuída de CI-39kDa, os resultados inferiores à média, menos dois desvios padrão, obtidos do grupo controle.

4.2. PESQUISA DE MUTAÇÕES EM GENES MITOCONDRIAIS

A pesquisa de mutações, nos casos (Anexos 2 e 3) com diminuição da expressão de CI-39kDa, foi realizada através do seqüenciamento dos genes suspeitos de estarem envolvidos com este defeito. Os genes candidatos escolhidos foram aqueles que codificam as subunidades do Complexo I e a subunidade da fração flavoproteína do Complexo II (*SDHA*), no caso com diminuição da atividade deste complexo. O seqüenciamento foi realizado nas regiões onde mutações já haviam sido descritas previamente.

4.2.1. Extração de DNA

Amostras de biópsias de músculo esquelético, inicialmente congeladas e estocadas a -80°C , foram pulverizadas em um pilão de porcelana, parcialmente preenchido com nitrogênio líquido. O material pulverizado foi incubado em 500 μL de uma solução RSB (Tris-HCl 10 mM – pH 7,4, 10 mM de NaCl, 25 mM de EDTA e 1% de SDS) contendo 1mg/mL de Proteinase K, a 50°C por 2 horas, ou a 37°C por 16 horas, até a solução tornar-se homogênea. O DNA total foi extraído uma vez com um volume de fenol, duas vezes com um volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e uma vez com um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Posteriormente, o DNA foi precipitado com um volume de isopropanol e lavado com etanol 70%, e então, dissolvido em 20 a 100 μL de tampão TE (10 mM Tris-HCl e 0,1 mM de EDTA, pH 8,0), dependendo do tamanho do precipitado obtido.

4.2.2. Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de genes mitocondriais

PCR é um método *in vitro* da síntese de ácido nucléico no qual um segmento particular de DNA pode ser especificamente replicado. Isto envolve dois *primers* (oligonucleotídeos) que flanqueiam o fragmento de DNA a ser amplificado seguido de ciclos repetidos de desnaturação por aquecimento do DNA, anelamento dos *primers* nas seqüências complementares e extensão destes anelados com a enzima DNA polimerase. Estes *primers* se hibridizam

com os filamentos opostos da seqüência-alvo e desencadeiam a síntese da seqüência de DNA pela *Taq* DNA polimerase entre os *primers*. O resultado disto é um acúmulo exponencial da seqüência do fragmento específico (Saiki, 1990).

A reação de PCR foi feita utilizando-se aproximadamente 10 ng de DNA, 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão de PCR, 20 nmoles de cada dNTP (deoxinucleotídeo trifosfato – A, T, C e G), 30 pmoles de cada *primer* e 2,5 unidades da enzima *Taq* DNA Polimerase (Fermentas). As condições das reações de PCR utilizadas e os *primers* estão citados na Tabela 4 e 5. A verificação da amplificação dos produtos da reação de PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% com Brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos foram purificados de acordo com as instruções do *Kit GeneClean® II* (BIO 101® Systems) e o procedimento resumido foi o seguinte: o produto de PCR (em solução ou fragmento de gel) foi diluído em *Nal* e incubado à temperatura ambiente, por 5 minutos, com *GlassMilk* (partículas de sílica). Em seguida, o pellet de *GlassMilk* foi submetido a duas lavagens com *NewWash*. A eluição do DNA foi realizada com 20µl de água por 5 minutos à temperatura ambiente.

Tabela 4: Condições das reações de PCR

Condições	Temperatura	Tempo
A	94°C	2 minutos
	94°C	30 segundos
	60°C	
	72°C	10 minutos
B	94°C	2 minutos
	94°C	30 segundos
	50°C	
	72°C	
	72°C	10 minutos

TABELA 5: PRIMERS UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES ESTUDADOS

	POSIÇÃO/ EXON	PRIMER F SEQÜÊNCIA 5'-3'	PRIMER B SEQÜÊNCIA 5'-3'	TAM. (pb)	COND.
GENE					
S					
<i>MT-ND1</i>	3307-4263	aggacaagagaaataaggcc	tgatggctagggtagctcat	621	A
<i>MT-ND2</i>	4470-5513	ccagcattccccctcaaacctaa	tgattgagatggggtagt	652	A
		tagcccccttctactctga	gcaaattcgaagaagcagcttc	1006	A
<i>MT-ND3</i>	10059-10406	cttggctcgaagccgcc	gcttgccatgattgtgagg	1097	A
<i>MT-ND4L</i>	10470-10766	cttggctcgaagccgcc	gcttgccatgattgtgagg	1097	A
		ctgtccccaacctttct	tgaagtcctgagagaggattatgacg	893	A
<i>MT-ND4</i>	10760-12139	tagccctcgtagtaacagccatt	gggtaacgagggtgtaagg	773	A
		caaccccgacatcattaccgggt	atgtaaggcgaggatgaaa	792	A
<i>MT-ND5</i>	12337-14148	actgttcatcggtgagagg	ggctccggctccaggcgttaatgggg	967	A
		aagcgcctatagcactcgaa	atgatggtgtcttggatatactacag	894	A
<i>MT-ND6</i>	14149-14673	tagccctcgtagtaacagccatt	gggtaacgagggtgtaagg	773	A
		1	actggctgagaacgaagga	ggaccaagaagctgaaga	214
<i>NDUFS4</i>	3	tgtaggctgttgaaacgtg	acagtggacttaacagcgt	353	B
	5	ctgctgtctgtctttcag	aagtaaccaagattcccagagg	411	A
<i>NDUFV1</i>	3	ccctcattgccttccctat	tctctcccacagccacatct	241	A
	5	gctgggaaactcacaccttt	caaagggagcctagccagat	288	A
	7	ctgacatgatccctttg	ggctgggtgtgaaccctta	228	A
	9	gatcatcaggccctctctg	acgcagaaggggtgtaata	202	A
<i>NDUFS1</i>	8	ttgctggacttgaccattga	cccaggaagaaaatgaacct	313	A
	9	gcacatagtaaacaccgtatgtg	ataagcaactcagattccagtagtc	298	A
	15	ctggcgacaaagtgagact	ctttgtttctggtgtcacagg	344	A
	19	aaagcatgtggccagtaagg	cctgtaaaggatcactgcactaca	340	A
<i>NDUFS2</i>	7	ggcctgggactttgacacta	ccagcgatacaggttggag	222	A
	13	cacccaaccttctccttga	ccagcctaggagattgaga	244	A
<i>NDUFV2</i>	2	ttccattgtgtaaattatgaatcct	tggatttaccaccaattcca	220	A
<i>NDUFS8</i>	5	gactgagctctccgagggtg	acatcaagcaggggtagg	385	A
<i>SDH-Fp</i>	10	ggcaccttgacattcacct	tctggctcctgaagaaaaca	236	A
	12	ttggtatggctgcttctatgg	actgacgggacagacacca	243	A
	13	ctgccctgatggaacttt	caccaggtggcaggaaaa	214	A

pb = pares de bases , Tam.= tamanho , Cond.= condições PCR

4.2.3. Seqüenciamento de genes candidatos

Os produtos de PCR purificados foram submetidos a uma das seguintes reações de seqüenciamento:

- 1 µL de BigDye[™] *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix Kit* (ABI PRISM[®]), aproximadamente 90 ng de produto de PCR purificado e 32 pmoles do *primer*. As condições e a purificação da reação foram feitas de acordo com as instruções do Kit do *BigDye*[™]. As condições utilizadas foram as seguintes: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos em 25 ciclos. O procedimento de purificação, resumido, foi o seguinte: o produto da reação foi misturado com acetato de sódio 3M (pH 4,6) e etanol 100%. A solução foi deixada à temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugada e o *pellet* foi lavado 2x com 250 µL de etanol 70%. O *pellet* foi levado à uma estufa a 55°C por 5 minutos e depois foi estocado a -20°C até a eletroforese.

- 4 µL de *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences), aproximadamente 90 ng de produto de PCR purificado e 32 pmoles do *primer*. As condições e a purificação da reação foram feitas de acordo com as instruções do Kit do *DYEnamic*. As condições utilizadas foram as seguintes: 95°C por 20 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 20 segundos em 25 ciclos. O procedimento de purificação resumido foi o seguinte: o produto da reação de PCR foi misturado com acetato de sódio (1,5 M, pH 8,0) / EDTA (250 mM) e depois foi adicionado etanol 95%. A lavagem foi feita como descrita acima.

A eletroforese foi realizada em seqüenciador automático ABI PRISM® 377. Os eletroferogramas foram visualizados utilizando-se o software Chromas versão 1.61 (Technelysium).

4.2.4. Análise das seqüências

A análise das seqüências obtidas foi feita de forma comparativa com as seqüências normais humanas de referência, obtidas através da pesquisa nos seguintes bancos de dados: *MITOMAP* (<http://www.mitomap.org>) e *Genatlas* (<http://www.genatlas.org>). Para esta comparação, utilizou-se a ferramenta *BLAST two sequences* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Para a caracterização das alterações encontradas, utilizou-se a análise da alteração prevista na seqüência de proteína, comparação com as seqüências de proteínas em outras espécies e pesquisa em banco de dados de polimorfismos *Human Mitochondrial Genome Database* (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd/search.html>).

As seqüências de referência utilizadas foram as seguintes: DNA mitocondrial (*GenBank* J01415), *NDUFS1* (*GenBank* NT 005403), *NDUFS2* (*GenBank* NT 079484), *NDUFS4* (*GenBank* NT 006431), *NDUFS8* (*GenBank* NT 033903), *NDUFVI* (*GenBank* NT 033903), *NDUFV2* (*GenBank* NT 010859), *SDHA* (*GenBank* NT 023089).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software StatView 5.0.1 versão para PowerPC (SAS Institute Inc.). A significância estatística foi estabelecida como $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CI-39kDa E SDH-Fp POR WESTERN BLOTTING

O estudo de Western blotting utilizando-se os anticorpos anti-CI-39kDa e anti-SDH-Fp mostrou a presença de bandas específicas e únicas para cada proteína estudada, com peso molecular de 39kDa e 70kDa, respectivamente.

5.1.1. Expressão de CI-39kDa no grupo controle

O grupo controle mostrou a expressão de CI-39kDa (CI-39kDa/SDH-Fp) variando de 0.57 a 1.80, com média de 1.030 e desvio padrão de 0.268 (Tabela 6). A análise da correlação entre expressão de CI-39kDa e idade ($R^2=0.199$), mostrou que a expressão desta proteína não sofre influência da idade (Figura 2).

Tabela 6: Expressão de CI-39kDa em relação à expressão de SDH-Fp no grupo controle .

Amostra	CI-39kDa/SDH-Fp
C1	1.12
C2	1.11
C3	1.05
C4	1.12
C5	0.60
C6	1.44
C7	0.91
C8	1.80
C9	0.84
C10	1.05
C11	0.89
C12	1.18
C13	0.72
C14	0.94
C15	1.09
C16	0.99
C17	0.88
C18	1.12
C19	1.03
C20	0.57
C21	1.17

5.1.2. Expressão de CI-39kDa no grupo de pacientes

O grupo de pacientes mostrou a expressão de CI-39kDa (CI-39kDa/SDH-Fp) variando de 0.29 a 1.86 (Tabela 7). A distribuição dos resultados obtidos, considerando-se a possibilidade de diagnóstico de doença mitocondrial mostrou que, analisando-se os grupos de pacientes separadamente, as médias de CI-39kDa/SDH-Fp, não foram estatisticamente diferentes em relação ao controle. As médias obtidas para os pacientes com diagnóstico de doença mitocondrial improvável, provável e possível, foram 1.192, 1.167 e 0.916, respectivamente (Tabela 8, Figura 3).

Para a identificação de amostras com diminuição da expressão de CI-39kDa, consideramos somente os valores inferiores a 0.49 (média menos dois desvios padrão do grupo controle). Assim, identificamos 2 amostras em um total de 56 pacientes estudados (1,12%) ou 1 em 10 com diagnóstico provável (10%) e 1 em 23 com diagnóstico possível (4,34%). As amostras nº 55 e nº 51 apresentaram os valores de 0,29 e 0,42, respectivamente (Figuras 4 e 5).

Tabela 7: Expressão de CI-39kDa em relação à expressão de SDH-Fp no grupo de pacientes.

no.	CI-39kDa/SDH-Fp		
P1	1.03	P40	1.34
P2	0.91	P41	0.64
P3	1.71	P42	0.72
P4	1.37	P43	1.11
P5	1.03	P44	0.86
P6	1.55	P45	1.29
P7	1.86	P46	0.67
P8	0.88	P47	0.85
P9	0.96	P48	0.72
P10	1.06	P49	1.00
P11	1.30	P50	0.99
P12	1.64	P51	0.42
P13	1.43	P52	1.20
P14	1.38	P53	0.74
P15	1.52	P54	1.18
P16	0.68	P55	0.29
P17	1.18	P56	0.78
P18	1.26		
P19	0.53		
P20	0.66		
P21	1.60		
P22	0.79		
P23	1.55		
P24	0.81		
P25	1.55		
P26	1.50		
P27	1.11		
P28	0.72		
no.	CI-39kDa/SDH-Fp		
P29	1.51		
P30	1.54		
P31	0.74		
P32	0.63		
P33	1.52		
P34	1.39		
P35	0.85		
P36	1.04		
P37	1.45		
P38	0.53		
P39	1.15		

Tabela 8: Expressão de CI-39kDa separados quanto ao diagnóstico: (improvável, possível e provável), juntamente com o grupo controle.

	Diagnóstico			
	improvável	possível	provável	controle
Média	1.192	0.916	1.167	1.030
Desvio padrão	0.359	0.309	0.442	0.268
Valor mínimo	0.63	0.42	0.29	0.57
Valor máximo	1.86	1.71	1.60	1.80
N	23	23	10	21

5.1.2.1. Análise da expressão de SDH-Fp no paciente nº 55

Uma análise mais detalhada da expressão de SDH-Fp foi realizada no paciente 55, pois este apresentava uma diminuição acentuada da atividade de SDH à histoquímica muscular. A expressão de SDH-Fp e CI-39kDa foram corrigidas pelo conteúdo mitocondrial, através da relação com a expressão de porina, proteína da membrana externa mitocondrial. Esta análise foi realizada com todas as amostras em um mesmo gel e mostrou que havia uma expressão diminuída tanto de SDH-Fp como CI-39kDa, sendo mais importante nesta última (Figura 6).

5.2. PESQUISA DE MUTAÇÕES EM GENES MITOCONDRIAIS

5.2.1. Genes codificadores para subunidades do complexo I

A análise dos genes codificados pelo DNAm para complexo I do paciente nº 55, mostrou um total de 14 alterações: 12 eram polimorfismos já descritos e 2 eram polimorfismos não descritos. Destas, somente em 4 houve a troca de aminoácidos e já estavam descritos (Tabela 9). No paciente nº 51, encontrou-se um total de 10 alterações, sendo todas polimorfismos já descritos. Destas, somente em 2 houve troca de aminoácido (Tabela 10).

A análise dos genes codificados pelo DNAn para complexo I foi feita, no total de 5 genes e 14 éxons estudados. No paciente nº 55, não foi encontrado nenhum polimorfismo ou mutação. Somente em 2 éxons houve a troca de nucleotídeo, mas estes

estavam em região onde ocorre variação alélica, de acordo com o banco de dados Genatlas (Tabela 11). No paciente nº 51, foram encontradas 5 alterações (Tabela 12). Destas, 4 já haviam sido descritas como variação alélica. Uma alteração no éxon 2 do gene *NDUFV2* teria a previsão da troca do aminoácido no último códon: de valina para metionina (V40M). Esta alteração foi confirmada por mais de um seqüenciamento (Figura 7).

TABELA 9: ALTERAÇÕES ENCONTRADAS PELO SEQÜENCIAMENTO DOS GENES PARA SUBUNIDADES DO COMPLEXO I, CODIFICADOS PELO DNAMT, NO PACIENTE Nº 55.

Gene	Alterações na seqüência de DNA	Previsão de substituição na seqüência de proteína	Tipo de alteração (mutação)	Descrição polimorfismo
<i>ND1</i>	NA	NA	NA	-
	4688 T>C	NA	sinônima	HMGD
<i>ND2</i>	4769 A>G	NA	sinônima	HMGD
	5147 G>A	NA	sinônima	HMDG
<i>ND3</i>	10398 A>G	T114A	de sentido	HMGD
<i>ND4L</i>	10873 T>C	NA	sinônima	HMGD
<i>ND4</i>	11719 G>A	NA	sinônima	HMGD
	12046 A>T	NA	sinônima	não descrito
<i>ND5</i>	12342 C>T	NA	sinônima	não descrito

	12705 C>T	NA	sinônima	HMGD
	13105 A>G	I257V	de sentido	HMGD
	13708 G>A	A458T	de sentido	HMGD
	13752 T>C	NA	sinônima	HMGD
	13886 T>C	L517P	de sentido	HMGD
<i>ND6</i>	14284 C>T	NA	sinônima	HMGD

NA = nenhuma alteração, HMGD = Human Mitochondrial Genome Database

TABELA 10: ALTERAÇÕES ENCONTRADAS PELO SEQÜENCIAMENTO DOS GENES PARA SUBUNIDADES DO COMPLEXO I, CODIFICADOS PELO DNAMT, NO PACIENTE Nº 51.

Gene	Alterações na seqüência de DNA	Previsão de substituição na seqüência de proteína	Tipo de alteração (mutação)	Descrição polimorfismo
<i>ND1</i>	3423 G>T	NA	Sinonima	HMGD
	4161 C>T	NA	Sinonima	HMGD
<i>ND2</i>	4769 A>G	NA	Sinonima	HMGD
<i>ND3</i>	10398 A>G	T114A	de sentido	HMGD
<i>ND4L</i>	NA	NA	NA	NA
<i>ND4</i>	10819 A>G	NA	Sinonima	HMGD
	11719 G>A	NA	Sinonima	HMGD
<i>ND5</i>	12705 C>T	NA	Sinonima	HMGD
<i>ND6</i>	14212 T>C	NA	Sinônima	HMGD

14365 G>C	NA	Sinônima	HMGD
14368 G>C	F102L	De sentido	HMGD

NA = nenhuma alteração, HMGD = Human Mitochondrial Genome Database

Tabela 11: Alterações encontradas pelo seqüenciamento dos genes para subunidades do complexo I, codificados pelo DNAn, no paciente nº 55.

Gene	Alterações na seqüência de DNA	Previsão de substituição na seqüência de proteína (posição)	Tipo de alteração (mutação)	Descrição do polimorfismo

N				
D	NA	NA	NA	-
U	A>C	NA (66)	sinônima	-
F	NA	NA	NA	-
S				
4				
Exon 1				
Exon 3				
Exon 5				
N				
D	NA	NA	NA	-
U	NA	NA	NA	-
F	NA	NA	NA	-
V				
1				
Exon 3				
Exon 5				
Exon 7				
Exon 9				
N				
D	NA	NA	NA	-
U	NA	NA	NA	-
F	NA	NA	NA	-
S				
1				

Exon 8				
Exon 9				
Exon 15				
Exon 19				
<hr/>				
<u><i>NDUFS2</i></u>				
Exon 7	NA	NA	NA	-
Exon 13	NA	NA	NA	-
<hr/>				
<i>N</i>				
<i>D</i>	T>C	NA (29)	sinônima	-
<i>U</i>				
<i>F</i>				
<i>V</i>				
<i>2</i>				
Exon 2				
<hr/>				
NA = Nenhuma alteração				

Tabela 12: Alterações encontradas pelo seqüenciamento dos genes para subunidades do complexo I, codificados pelo DNA, no paciente nº 51.

Gene	Alterações na seqüência de DNA	Previsão de substituição na seqüência de proteína (posição)	T i p o d e	D e s c r i ç ã o p

			a l t e r a ç ã o (m u t a ç ã o)	re vi a c o m o p o l i m o r f i s m o
N				
D	G>C	NA (4)	sinônima	-
U	A>C	NA (66)	sinônima	-
F	NA	NA	NA	-
S				
4				
Exon 1				
Exon 3				
Exon 5				
N				
D	NA	NA	NA	-
U	NA	NA	NA	-
F	NA	NA	NA	-

V				
1				
Exon 3				
Exon 5				
Exon 7				
Exon 9				

N				
D	NA	NA	NA	-
	NA	NA	NA	-
U	NA	NA	NA	-
F	NA	NA	NA	-
S				
1				
Exon 8				
Exon 9				
Exon 15				
Exon 19				

<u>NDUFS2</u>				
Exon 7	NA	NA	NA	-
Exon 13	NA	NA	NA	-

N				
D	T>C	NA (29)	Sinônima	-
U	GTG>ATG	V40M	De sentido	-
F				
V				
2				
Exon 2				
N				
D	NA	-	-	-
U				
F				
S				
8				
Exon 5				
NA = Nenhuma alteração				

5.2.2. Gene *SDHA* codificador da subunidade flavoproteína do Complexo II

A análise dos exons 10, 12 e 13 mostrou apenas uma alteração no éxon 12 (Tabela 13). Trata-se de uma troca heterozigota que leva à modificação da seqüência nucleotídica GTC para TTG, causando uma modificação no códon 384 de *SDHA*, de valina para leucina (Figura 8). Esta alteração foi confirmada por mais de um seqüenciamento.

Comparamos a seqüência de aminoácidos de SDH-Fp, com a troca de valina para leucina, no banco de dados Genbank, com seqüências depositadas

de *Homo sapiens* e outras espécies, para sabermos se esta alteração poderia ser considerada uma mutação patogênica. Assim, observamos o mesmo aminoácido na seqüência de SDH-Fp em *Homo sapiens* (XP 171032) *Plasmodium falciparum*, *Caenorhabditis elegans* e *Rickettsia prowazekii* e diferentes aminoácidos em 6 outras espécies (Figura 8). Deste modo, esta alteração poderia ser considerada um polimorfismo, pois está localizada em uma região não conservada entre as espécies, ou seja, não possui homologia com o aminoácido da mesma seqüência de proteína de outras espécies.

Tabela 13: Alterações encontradas pelo seqüenciamento do gene para a subunidade flavoproteína do complexo II, codificado pelo DNAn, no paciente nº 55.

Gene <i>SDHA</i>	Alterações na seqüência de DNA	Previsão de substituição na seqüência de proteína	Tip o de alt era çã o (m uta çã o)	D e s c ri çã o p r e vi a c o m o p o li m o r f is m o
Exon 10	NA	NA	NA	-
Exon 12	G>T	V384L	Sim	não
	C>T	NA	sinônima	-
	C>T	NA	sinônima	-
Exon 13	A>G	NA	sinônima	-

A>G	NA	sinônima	-
-----	----	----------	---

6. DISCUSSÃO

A deficiência isolada do complexo I é uma das causas mais freqüentes de disfunções da cadeia respiratória mitocondrial (Loeffen *et al.*, 2000). No entanto, o estudo molecular deste complexo apresenta uma série de dificuldades por ser o maior complexo da cadeia respiratória e por conter subunidades codificadas tanto pelo DNAm_t como pelo DNAn. O diagnóstico de deficiência do complexo I é feito principalmente pela avaliação da atividade enzimática deste complexo, pois ao contrário dos complexos II e IV, não temos um método histoquímico para o complexo I. Entretanto, a análise das atividades enzimáticas dos complexos respiratórios não é realizada rotineiramente nos centros do Brasil e apresenta algumas dificuldades técnicas em relação aos métodos utilizados e variação nos limites de normalidade (Wiedemann *et al.*, 2000; Chretien & Rustin, 2003; Lombes, 2004). Assim, a padronização de novos métodos diagnósticos para esta deficiência seria de grande utilidade para a prática clínica.

A identificação de deficiências da cadeia respiratória pode ser realizada utilizando-se o método de *Western blotting* com anticorpos contra pelo menos uma subunidade de cada um dos cinco complexos da fosforilação oxidativa. Este método é relativamente rápido e facilmente realizado, requerendo menor quantidade de amostra do que os ensaios enzimáticos (Triepels *et al.*, 2001a). Uma avaliação da expressão de 6 subunidades do complexo I (39,30,20,18,15 e 8 kDa) em pacientes com deficiência isolada deste complexo mostrou que a expressão da subunidade de 39kDa apresentava estreita correlação com a

atividade enzimática (Triepels *et al.*, 2001a). O fato da subunidade de 39kDa estar diminuída na análise das subunidades isoladas, sugere que ela seja perdida e degradada quando o complexo não é montado e que tenha um papel importante no complexo I.

Recentemente vários estudos têm tentado elucidar o processo de montagem do Complexo I, utilizando-se de amostras de pacientes e análise por BN-PAGE (*Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), que possibilita a avaliação dos complexos na sua forma nativa (Antonicka *et al.*, 2003; Ugalde *et al.*, 2004a). Ugalde *et al.* (2004a) observaram que nos 6 pacientes estudados, com mutações comprovadas em genes nucleares, havia uma alteração na montagem do complexo I. Neste mesmo trabalho, de 9 pacientes onde o defeito gênico não foi encontrado nos genes de proteínas estruturais do Complexo I, em 5 ficou demonstrado um problema na montagem do complexo, sendo o restante causado provavelmente, por algum defeito catalítico. Os resultados como um todo demonstram uma maior freqüência de defeitos de montagem como causa das deficiências do complexo I, já que 73% dos pacientes estudados apresentavam diminuição do Complexo I íntegro (Ugalde *et al.*, 2004a).

O modelo atual da biogênese e montagem do complexo I é baseado em estudos com *N. crassa*, que contém aproximadamente 35 subunidades, somente 4 não são encontradas no complexo I de mamíferos e cuja função continua desconhecida (Videira & Duarte, 2002; Carrol *et al.*, 2002). A análise de subcomplexos indicou que a montagem do complexo I humano é um processo semi-sequencial, no qual diferentes subcomplexos pré-montados são unidos para formar o complexo total

(Ugalde *et al.*, 2004b). Propõe-se que a via de montagem do complexo I seja a seguinte: a primeira etapa é a montagem parcial do braço periférico no qual, dois intermediários (incluindo as subunidades de 49, 39 e 30 kDa) são combinados. Este complexo é então pareado às diversas subunidades do braço de membrana (incluindo *NDI*), resultando em uma membrana de ligação de proteína. Subseqüentemente, a última parte do braço periférico (incluindo as subunidades PSST, 24 e 18 kDa) é adicionada e o braço de membrana é completado (Triepels *et al.*, 2001b; Antonicka *et al.*, 2003).

A função exata da subunidade de 39kDa ainda não está totalmente esclarecida. Esta subunidade é importante para a ligação com o NADPH, visto que a ruptura do seu gene homólogo em *Neurospora crassa* resulta na ausência desta ligação (Schulte *et al.*, 1999). Apesar desta ligação com o NADPH não estar envolvida no transporte de elétrons, a perda desta subunidade leva à diminuição da atividade do complexo I (Schulte *et al.*, 2001). Sugere-se ainda, que a subunidade de 39kDa possa servir como âncora para a conexão entre os braços periférico e de membrana (Ugalde *et al.*, 2004b).

Em nosso estudo, observamos que a frequência de diminuição da expressão de CI-39 kDa foi baixa na nossa amostra de pacientes com suspeita de doença mitocondrial, de apenas 6% se considerarmos os casos com diagnóstico possível e provável, segundo o critério utilizado. Podemos pensar nas seguintes razões para este resultado: (1) a frequência de defeitos na montagem do complexo I, que seria detectada pela nossa análise não é tão alta como se esperava; (2) a expressão desta subunidade não estaria detectando todos os casos de defeitos de montagem do

complexo I; (3) o grau de suspeita para doença mitocondrial pode ter sido muito elevado, acima do real número de casos com esta doença, já que na maioria dos casos não temos a confirmação do diagnóstico de doença mitocondrial. Nos casos diagnosticados no Centro de Doenças Mitocondriais de Nijmegen, a frequência das deficiências do complexo I foi relatada como 22.7%, tendo sido a causa mais frequente de deficiências da fosforilação oxidativa (Loeffen *et al.*, 2000). No Texas Children's Hospital a frequência observada foi um pouco maior, 32% para deficiência isolada de Complexo I (Scaglia *et al.*, 2005). A diferença em relação ao nosso estudo, é que avaliamos casos com suspeita diagnóstica, mas sem comprovação, além disso, excluimos os casos com as mutações mais frequentes do DNAm, e nos estudos acima, a frequência foi calculada baseando-se no total de casos com confirmação diagnóstica. Outra possibilidade seria o limite inferior da normalidade estar muito, o que levaria à exclusão de casos com expressão em níveis intermediários. Isto poderia ser resolvido com um grupo controle maior. No entanto, existe uma dificuldade para a obtenção de amostras controle, pois utilizamos material de biópsias obtidas para fins diagnósticos. Assim, biópsias com músculo normal ou com alterações mínimas não são facilmente encontradas. A suspeita de doença mitocondrial é muito frequente, principalmente porque estas doenças podem afetar praticamente qualquer tecido, qualquer idade, ter apresentações clínicas muito variadas, desde pacientes oligosintomáticos a pacientes com comprometimento multisistêmico. Além disso, a confirmação diagnóstica é muito difícil na maioria das vezes, o que também dificulta a avaliação da prevalência destas doenças (Thorburn *et al.*, 2004). Por isso, a

avaliação de pacientes com suspeita diagnóstica pode levar a baixos índices de casos com alterações. Com um enfoque diferente do nosso trabalho, voltado às principais mutações de ponto no DNAm, Castro (2002) também observou uma baixa frequência (6%) de casos com alteração em estudo de pacientes com suspeita de doença mitocondrial com comprometimento neurológico. Apesar das análises serem diferentes, o nosso estudo e o de Castro (2002) podem sugerir o alto índice de suspeita diagnóstica no Brasil, principalmente nos casos com comprometimento neurológico e a dificuldade na confirmação do diagnóstico de doença mitocondrial nestes casos.

O primeiro estudo demonstrando que mutações no complexo I interferem na função ou montagem de outros complexos da fosforilação oxidativa foi recentemente descrito em um modelo de *Caenorhabditis elegans* (Grad & Lemire, 2004). Defeitos na montagem do complexo I foram associados a mutações em diversos genes: *NDUFS2*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *MTND6* (Ugalde *et al.*, 2004a, Ugalde *et al.*, 2003). Os casos vistos em nosso estudo, no entanto, não apresentavam nenhuma das mutações já descritas em genes para subunidades do complexo I. Identificamos somente uma alteração, que podemos considerar como suspeita, em *NDUFV2* no paciente nº 51.

O gene *NDUFV2* (subunidade de 24 kDa) é um componente da fração da flavoproteína do complexo I e é codificado pelo DNAn. Juntamente com as subunidades de 75 e 51 kDa, a subunidade de 24 kDa forma uma unidade estrutural e funcional do complexo I (Ohnishi *et al.*, 1985). Mutações neste gene foram descritas apenas duas vezes: (1) relacionada à predisposição para

doença de Parkinson (Hattori *et al.*, 1998) e (2) em uma criança com cardiomiopatia hipertrófica e encefalopatia com hipotonia (Benit *et al.*, 2003a). A alteração encontrada por nós, não foi descrita previamente e leva à mudança de um aminoácido no último códon do segundo éxon: de valina para metionina (V40M). O fato de estar localizada em um gene que codifica para uma subunidade estrutural poderia indicar que esta seja uma alteração patogênica, entretanto a troca não leva a mudança na polaridade dos aminoácidos e nem altera as regiões doadoras eceptoras de *splicing*. Por outro lado, podemos considerar que esta alteração encontra-se em local moderadamente conservado pois este resíduo está presente em 11 de 12 espécies analisadas. O quadro clínico do paciente tem alguma similaridade com o descrito por Benit *et al.* (2003a), pois o paciente era uma criança de 8 meses que apresentava quadro de encefalopatia e hipotonia, mas não apresentava cardiomiopatia.

A deficiência do complexo I pode ser vista como uma deficiência isolada ou como parte de um quadro de deficiências combinadas dos complexos da fosforilação oxidativa. As deficiências combinadas envolvendo o complexo I, aparecem em aproximadamente 21.7% dos distúrbios da fosforilação oxidativa vistos no Centro de Doenças Mitocondriais de Nijmegen (Loeffen *et al.*, 2000). Na maioria dos casos, são decorrentes de mutações no DNAMt que levam a uma alteração na síntese de proteínas, como mutações em genes para tRNAs ou rearranjos (Wiedemann *et al.*, 2000). As combinações observadas foram as deficiências dos complexos: I + IV, I + III, I + III + IV, I + piruvato desidrogenase e I + IV + piruvato desidrogenase (Loeffen *et al.*, 2000). Deficiências combinadas

do complexo I e III já foram relatadas em pacientes portadores de mutações em *NDUFS4* (Budde *et al.*, 2000). Recentemente, observou-se que mutações em *NDUFS2* e *NDUFS4* podem afetar a estabilidade do complexo III (Ugalde *et al.*, 2004a). Por outro lado, Acín-Pérez *et al.* (2004) mostram que a falta do complexo III montado leva a uma instabilidade do complexo I, resultando em uma deficiência combinada dos complexos I e III. Os complexos I e III estão associados, na forma de respirassomos, nos quais o complexo IV pode também se ligar. A ruptura da associação desses complexos pode gerar uma instabilidade dos respirassomos, que quando não formados, levam à deficiência combinada (Schägger *et al.*, 2004).

O outro paciente (nº 55) com diminuição da expressão de CI-39kDa, apresenta quadro compatível com uma deficiência combinada, pois a histoquímica do músculo esquelético mostra deficiência dos complexos II e IV (Anexo 3). Assim, este paciente apresenta, pelas avaliações realizadas até o momento, deficiências dos complexos I, II e IV. Não analisamos o complexo III neste trabalho, pois nos preocupamos em identificar as deficiências do complexo I, mas certamente este complexo será analisado em estudo posterior. A presença de deficiência do complexo II, cujas subunidades são codificadas pelo DNA nuclear, afastam a possibilidade de uma etiologia no DNAm. Poderíamos pensar em um defeito em genes para o complexo I, mas nossa análise inicial não mostrou alterações já descritas ou suspeitas. Pelo fato de termos um exemplo de instabilidade do complexo I, ocorrendo secundariamente a um defeito em outro complexo (Acín-Pérez *et al.*, 2004), também verificamos se

alterações em *SDHA* poderiam ser a causa do defeito observado, mas não observamos alterações previamente descritas neste gene.

Além das deficiências combinadas dos complexos respiratórios, este paciente ainda apresentava um acúmulo lipídico no músculo esquelético. Teoricamente, deficiências nos complexos da cadeia respiratória podem afetar outras vias mitocondriais envolvidas na produção de energia como o ciclo de oxidação dos ácidos graxos. Isto porque o complexo I oxida o NADH reduzido e produz NAD⁺, um cofator essencial nas desidrogenases responsáveis pela β – oxidação dos ácidos graxos. Têm sido proposto que a deficiência da NAD⁺ pode interferir com a oxidação dos ácidos graxos, levando a um defeito secundário na oxidação dos ácidos graxos (Bennett *et al.*, 1994). Deficiências combinadas dos Complexos I e II, junto com a deficiência de múltiplas desidrogenases acil coenzima A causando acúmulo lipídico em músculo, foram observadas em pacientes com uma miopatia responsiva à riboflavina (Antozzi *et al.*, 1994; Russel *et al.*, 2003). Ainda não se sabe a patogênese desta doença, mas acredita-se que a falta de riboflavina comprometa as flavoproteínas que incluem os complexos I e II da cadeia respiratória (Antozzi *et al.*, 1994).

Assim, para chegarmos a um diagnóstico mais preciso destes pacientes, serão necessários outros estudos mais detalhados. Apesar de termos encontrado uma baixa frequência de casos com expressão diminuída da proteína CI-39kDa, os casos identificados são bastante promissores. É possível que uma ampliação deste estudo, com um maior número de pacientes, avaliação clínica detalhada e estudo de outras subunidades, demonstre que os estudos por *Western blotting* possam ser bastante úteis

para a o diagnóstico e direcionamento da investigação dos casos com suspeita de doença mitocondrial.

7. CONCLUSÕES

1. A diminuição da expressão da proteína CI-39kDa nos casos com diagnóstico possível e provável para doença mitocondrial, foi baixa (6%).

2. A avaliação molecular dos casos com diminuição da expressão de CI-39kDa mostrou que mutações em genes, codificados pelo DNAm, e mutações conhecidas em genes nucleares para subunidades do complexo I não foram a causa do defeito destes pacientes

3. Observamos uma mutação não descrita no gene *NDUFV2*, que pode ser a causa de uma alteração no complexo I, mas sua patogenicidade ainda deverá ser melhor investigada em estudo posterior.

8. REFERÊNCIAS

Acín-Pérez R, Bayona-Bafaluy M P, Fernández-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C, *et al.* Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell.* 2004; 13 (6): 805-815.

Anderson S, Bankier A T, Barrel B G, De Bruijin M H L, Coulson A R, Drouin J, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981; 290 (5806): 457-465.

Antonicka H, Ogilvie I, Taivassalo T, Anitori R P, Haller R G, Vissing J, *et al.* Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem.* 2003; 278 (44): 43081-43088.

Antozzi C, Garavaglia B, Mora M, Rimoldi M, Morandi L, Ursino E, *et al.* Late-onset riboflavin-responsive myopathy with combined multiple acyl coenzyme A dehydrogenase and respiratory chain deficiency. *Neurology.* 1994; 44 (11): 2153-2158.

Benit P, Chretien D, Kadhom N., Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Cabral A, *et al.* Large-scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. *Am J Hum Genet.* 2001; 68 (6): 1344-1352.

Benit P, Beugnot R, Chretien D, Giurgea I, De Lonlay-Debeney P, Issartel JP, *et al.* Mutant NDUFV2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mutat.* 2003(a); 21 (6): 582-586.

Benit P, Steffann J, Lebon S, Chretien D, Kadhom N, de Lonlay P, *et al.* Genotyping microsatellite DNA markers at putative disease loci in inbred/multiplex families with respiratory chain complex I deficiency allows rapid identification of a novel nonsense mutation (IVS1nt -1) in the NDUFS4 gene in Leigh syndrome. *Hum Genet.* 2003(b); 112 (5-6): 563-566.

Bennett M J, Weinberger M J, Sherwood W G & Burlina A B. Secondary 3-hydroxydicarboxylic aciduria mimicking long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 1994; 17 (3): 283-286.

Bentlage H, Coo R, Laak H ter, Sengers R, Trijbels F, Ruitenbeek W, *et al.* Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. 1. Decreased amounts of assembled oxidative phosphorylation complexes in mitochondrial encephalomyopathies. *Eur J Biochem* 1995; 227 (3): 909-915.

Bogenhagen D & Clayton D A. The number of mitochondrial ribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells: quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem.* 1974; 249 (24): 7991-7995.

Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignoti E, *et al.* Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet.* 1995; 11 (2): 144-149.

Budde S M S, Heuvel L van den, Janssen A J, Smeets R, Buskens C, De Meirleir L, *et al.* Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275 (1): 63-68.

Carrol J, Shannon R J, Fearnley I M, Wlaker J E & Hirst J.
Definition of the nuclear encoded protein composition of
bovine heart mitochondrial complex I. *J Biol Chem.* 2002; 277
(52): 50311-50317.

Castro, Daniela Medeiros. Caracterização das principais mutações de ponto do DNA mitocondrial em um grupo de pacientes com doenças neurodegenerativas. 2002. 82 f. Dissertação de mestrado. UNICAMP, 2002.

Chretien D & Rustin P. Mitochondrial oxidative phosphorylation: pitfalls and tips in measuring and interpreting enzyme activities. *J Inherit Metab Dis.* 2003; 26 (2-3):189-198.

Clayton D A. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 1982; 28 (4): 693-705.

Clayton D A. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Ann. Rev Cell Biol.* 1991; 7: 453-478.

Clayton D A. Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inherit Metab Dis.* 1992; 15 (4): 439-447.

Conrad C C, Malakowsky C A, Talent J, Rong D, Lakdawala S & Gracy R W. Chemiluminescent standards for quantitative comparison of two-dimensional electrophoresis western blots. *Proteomics* 2001; 1 (3): 365-369.

DiMauro S & Schapira A H V. Mitochondrial disorders in neurology. Editora Butterworth-Heinemann Ltda 1994; p. 01-09.

DiMauro S, Bonilla E, De V D. Does the patient have a mitochondrial encephalomyopathy? *J Child Neurol.* 1999; 14 suppl 1: S23-S35.

DiMauro S & Schon E A. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 106 (1): 18-26.

DiMauro S. Mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1659 (2-3): 107-114.

DiMauro S & Hiram M. Mitochondrial encephalomyopathies: na update. *Neuromuscul Disord.* 2005; 15 (4): 276-286.

Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C, Vila M R, Shanske S, Hirano M, *et al.* Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann Neurol.* 2003; 54 (4): 524-526.

Goto Y, Nonaka I & Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu (UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990; 348 (6302): 651-653.

Grad L I & Lemire B D. Mitochondrial complex I mutations in *Caenorhabditis elegans* produce cytochrome c oxidase deficiency, oxidative stress, and vitamin-responsive lactic acidosis. *Hum Mol Genet.* 2004; 13 (3): 303-314.

Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54: 1015-1069.

Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, Suzuki H & Mizuno Y. Genotype in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to Parkinson disease. *Genomics* 1998;49 (1):52-58.

Heuvel L van den, Ruitenbeek W, Smeets R, Gelman-Kohan Z, Elpeleg O, Loeffen J, *et al.* Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-KDa (AQDQ) subunit. *Am J Hum Genet.* 1998; 62 (2): 262-268.

Holt I J, Harding A E, Petty R K & Morgan-Hughes J A. A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet.* 1990; 46 (3): 428-433.

Kraytsberg Y, Schwartz M, Brown T A, Ebralidse K, Kunz W S, Clayton D A, *et al.* Recombination of human mitochondrial DNA. *Science* 2004; 304 (5673): 981.

Leigh, D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Biochem Mol Biol.* 1951; 14 (3): 216-221.

Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R, *et al.* The first nuclear-encoded Complex I mutation in a patient with Leigh Syndrome. *Am J Hum Genet.* 1998; 63 (6): 1598-1608.

Loeffen J L, Smeitink J A, Trijbels J M, Janssen A J, Triepels R H, Sengers R C, & Heuvel L P van den. Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects. *Hum Mutat.* 2000; 15 (2): 123-134.

Loeffen J, Elpeleg O, Smeitink J, Smeets R, Stockler-Ipsirogly S, Mandel H, *et al.* Mutations in the complex I NDUF52 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. *Ann Neurol.* 2001; 49 (2): 195-201.

Lombes A. Consensual protocols for the spectrophotometric assays of respiratory chain activities. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1657 Suppl 1: 10.

Moraes C T, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda A F, *et al.* Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med.* 1989; 320 (20): 1293-1299.

Morris A A, Leonard J V, Brown G K, Bidouki S K, Bindoff L A, Woodward C, *et al.* Deficiency of respiratory chain complex I is a common cause of Leigh disease. *Ann Neurol.* 1996; 40 (1): 25-30.

Munnich A, Rustin P, Rötig A, Chretien D, Bonnefont J P, Nuttin C, *et al.* Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis.* 1992; 15 (4): 448-455.

Munnich A & Rustin P. Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet.* 2001; 106 (1): 4-17.

Ohnishi T, Ragan C I & Hatefi Y. EPR studies of iron-sulfur clusters in isolated subunits and subfractions NADH-ubiquinone oxidoreductase. *J Biol Chem.* 1985; 260 (5): 2782-2788.

Oliver N A & Wallace D C. Assignment of two mitochondrially synthesized polypeptides to human mitochondrial DNA and their use in the study of intracellular mitochondrial interaction. *Mol Cell Biol.* 1982; 2 (1): 30-41.

Petruzzella V, Vergari R, Puzziferri I, Boffoli D, Lamantea E, Zeviani M & Papa S. A nonsense mutation in the *NDUFS4* gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001; 10 (5): 529-535.

Rahman S, Blok R B, Dhal H H, Danks D M, Kirby D M, Chow C W, *et al.* Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol.* 1996; 39 (3): 343-351.

Riordan-Eva P & Harding A E. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med Genet.* 1995; 32 (2): 81-87.

Robinson B H. Human Complex I Deficiency: Clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1364 (2): 271-286.

Rötig A, Cormier V, Blanche S, Bonnefont J P, Ledest F, Romero N, *et al.* Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest.* 1990; 86 (5): 1601-1608.

Russel A P, Schrauwen P, Somm E, Gastaldi G, Hesselink M K C, Schaart G, *et al.* Decreased fatty acid β – oxidation in riboflavin – responsive, multiple acyl coenzyme A dehydrogenase – deficient patients is associated with an increase in uncoupling protein – 3. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88 (12): 5921-5926.

Saiki R K. Amplification of Genomic DNA. *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* Acad Press 1990; p. 13-20.

- Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 1999; 283 (5407): 1488-1493.
- Satoh M & Kuroiwa T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp Cell Res.* 1991; 196 (1): 137-140.
- Sazanov L A, Peak-Chew S Y, Fearnley I M & Walker J E. Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry* 2000; 39 (24): 7229-7235.
- Scaglia F, Towbin J A, Craigen W J, Belmont J W, Smith E O, Neish S R, *et al.* Clinical spectrum, morbidity and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 2004; 114 (4): 925-931.
- Schägger H & Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 2000; 19 (8): 1777-1783.
- Schägger H, Coe R, Bauer M F, Hofmann S, Godinot C & Brandt U. Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 2004; 279 (35): 36349-36353.

Schuelke M, Smeitink J, Mariman E, Loeffen J, Plecko B, Trijbels F, *et al.* Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 1999; 21 (3): 260-261.

Schuelke M, Detjen A, van den Heuvel L, Korenke C, Janssen A, Smits A, *et al.* New nuclear encoded mitochondrial mutation illustrates pitfalls in prenatal diagnosis by biochemical methods. *Clin Chem.* 2002; 48 (5): 772-775.

Schulte U, Haupt V, Abelmann W, Fecke W, Brors B, Rasmussen T, *et al.* A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex. *J Mol Biol.* 1999; 292 (3): 569-580.

Schulte U. Biogenesis of respiratory complex I. *J Bioenerg Biomembr.* 2001; 33 (3): 205-212.

Schwartz M & Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New Engl J Med.* 2002; 347 (8): 576-580.

Schwartz M & Vissing J. No evidence of paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *J Neurol Sci.* 2004; 218 (1-2): 99-101.

Shoffner J M, Lott M T, Lezza A M S, Seibel P, Ballinger S W & Wallace D C. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA^{Lys} mutation. *Cell* 1990; 61 (6): 931-937.

Shoffner J M, Fernhoff P M, Krawiecki N S, Caplan D B, Holt P J & Koontz D A. Subacute necrotizing encephalopathy: oxidative phosphorylation defects and the ATPase 6 point mutation. *Neurology* 1992; 42 (11): 2168-2174.

Smeitink J & Heuvel L van den. Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am J Hum Genet.* 1999; 64 (6): 1505-1510.

Smeitink J, Heuvel L van den & DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet.* 2001a; 2 (5): 342-352.

Smeitink J, Sengers R, Trijbels F & Heuvel L van den. Human NADH: ubiquinone oxidoreductase. *J Bioenerg Biomembr.* 2001b; 33 (3): 259-266.

Taanman J W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410 (2): 103-123.

Taylor R W, McDonnell M T, Blakely E L, Chinnery P F, Taylor G A, Howell N, *et al.* Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial contribution. *Ann Neurol.* 2003; 54 (4): 521-524.

Thorburn D R. Practical problems in detecting abnormal mitochondrial functions and genomes. *Hum Reprod.* 2000; 15 (supl.2): 57-67.

Thorburn D R & Smeitink J. Diagnosis of mitochondrial disorders: clinical and biochemical approach. *J Inherit Metab Dis.* 2001; 24 (2): 312-316.

Thorburn D R, Sugiana C, Salemi R, Kirby D M, Worgan L, Ohtake A & Ryan M T. Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659 (2-3): 121-128.

Towbin H, Staehelin T & Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76 (9): 4350-4354.

Triepels R H, van den Heuvel L P, Loeffen J L, Buskens C A, Smeets R J, Rubio Gozalbo M E, *et al.* Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. *Ann Neurol.* 1999; 45 (6): 787-790.

Triepels R, Hanson B J, Heuvel L van den, Sundell L, Marusich M, Smeitink J A & Capaldi R A. Human complex I defects can be resolved by monoclonal antibody analysis into distinct subunit assembly patterns. *J Biol Chem.* 2001a; 276 (12): 8892-8897.

Triepels R, Heuvel L van den, Trijbels J & Smeitink J. Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet.* 2001b; 106 (1): 37-45.

Trijbels J M F, Scholte H R, Ruitenbeek R C A, Sengers A J M, Janssen H F M & Busch H F M. Problems with the biochemical diagnosis in mitochondrial (encephalo-) myopathies. *Eur J Pediatr.* 1993; 152 (3): 178-184.

Ugalde C, Triepels R H, Coenen M J, Heuvel LP van den, Smeets R, Uusimaa J, *et al.* Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Ann. Neurol.* 2003; 54 (5): 665–669.

Ugalde C, Janssen R J, Heuvel L van den, Smeitink J A M & Nijtmans L G L. Differences in assembly or stability of complex I and other mitochondrial OXPHOX complexes in inherited complex I deficiency. *Hum Mol Genet.* 2004(a); 13 (6): 659-667.

Ugalde C, Vogel R, Huijbens R, Heuvel B van den, Smeitink J & Nijtmans L. Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet.* 2004(b); 13 (20): 2461-2472.

Videira A & Duarte M. From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1555 (1-3): 187-191.

Walker J E. The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q Rev Biophys.* 1992; 25 (3): 253-324.

Wallace D C. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 1992; 61: 1175-1212.

Wallace D C. Mitochondrial DNA mutations in diseases of energy metabolism. *J Biomembr.* 1994; 26 (3): 241-250.

Westhuizen F H van der, Heuvel L van den, Smeets R, Veltman J A, Pfundt R, Kessel A G van, *et al.* Human mitochondrial complex I deficiency: investigating transcriptional responses by microarray. *Neuropediatrics* 2003; 34 (1): 14-22.

Wiedemann F R, Vielhaber S, Schroder R, Elger C E & Kunz W S. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Anal Biochem.* 2000;279 (1): 55-60.

Wolf N I & Smeitink A M. Mitochondrial disorders – a proposal for consensus diagnostic criteria in infants and children. *Neurology* 2002; 59 (1): 1402-1405.

Zeviani M, Tiranti V & Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine (Baltimore)* 1998; 77 (1): 59-72.

9. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

Anexo 2

Paciente nº 51 – Resumo do caso

Paciente de 8 meses de idade, sexo masculino, branco, nascido de termo, sem intercorrências, porém nunca sustentou a cabeça e apresentava-se hipotônico. Aos 2 meses, foi visto respiração ruidosa e suspeitado de laringotraqueomalácia. Aos 4 meses de idade começou a apresentar crises epiléticas caracterizadas por piscamento, sialorréia, algumas vezes com abalos clônicos em membro superior direito. Evoluiu com aumento da frequência das crises chegando a necessitar de internação com hidantalização. Durante internação evoluiu com pneumonia e insuficiência respiratória, ficando internado em unidade de terapia intensiva. Foi avaliado durante internação. Ao exame físico mostrava-se com hipotonia global, reflexos profundos aumentados globalmente, sem contacto com o meio. Foi tratado com anticonvulsivantes (em uso de valproato, fenobarbital e clobazam).

Exames realizados incluem liquor normal, lactato no sangue normal, Ressonância magnética mostrando áreas de hiposinal em T1 e hipersinal em T2, não captantes de contraste, de localização cortico-subcorticais em regiões temporais, frontal e transição parieto-occipital esquerda. EEG mostrou atividade

epileptiforme fronto temporal direita. US abdome e Ecocardiograma normais. Creatino quinase elevada. Foi realizada uma extensa investigação para erros inatos do metabolismo que não mostrou alterações.

Anexo 3

Paciente nº 55 – Resumo do caso

Paciente de 27 anos, sexo feminino, branca, refere que iniciou quadro de fraqueza muscular em membros inferiores aos 7 anos de idade, evoluindo com piora progressiva, de tal forma que hoje, não consegue deambular, e encontra-se em cadeira de rodas. O quadro iniciou com comprometimento de musculatura proximal evoluindo para musculatura distal e comprometimento de membros superiores. Refere também disfagia acompanhando o quadro. Até os 7 anos foi uma criança normal, com desenvolvimento neuropsicomotor apropriado.

Nega consangüinidade ou quadro semelhante na família, mas tem 3 irmãos com “traço falciforme” e uma irmã faleceu por problema hematológico.

O exame físico mostra uma tetraparesia flácida com predomínio proximal, sensibilidade normal, reflexos diminuídos globalmente e fraqueza da musculatura facial, palato e língua.

Eletroneuromiografia mostrou padrão miopático e biópsia muscular mostrou uma diminuição difusa da atividade de succinato desidrogenase, acúmulo lipídico e fibras musculares com proliferação mitocondrial visto por aumento na atividade da citocromo c oxidase, mas ao mesmo tempo, outras fibras com diminuição da atividade da citocromo c oxidase.

ABSTRACT

Mitochondrial diseases are caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA (nDNA), leading to abnormal function of the oxidative phosphorylation. One of the most frequent nDNA defects described in this group of diseases are Complex I deficiency. Complex I is the largest enzymatic complex of the respiratory chain, contains 42 subunits (7 are mtDNA encoded). It is proposed that a 39kDa subunit (CI-39kDa) expression closely correlates with the enzymatic activity of complex I. Thus we could hypothesize that a decrease in the expression of CI-39kDa, detected by Western blotting, would be a good diagnostic method for complex I deficiencies, considering the requirement of low amounts of frozen biopsied tissue as a good advantage of this method. The aim of this study was to evaluate the frequency of decreased expression of the CI-39kDa in skeletal muscle of patients with a suspicion for mitochondrial disease and to verify whether known mutations in Complex I subunit genes are associated with a decrease in the expression of this protein. Total proteins were obtained by skeletal muscle lysates of 56 patients and 21 controls. Proteins were electrophoresed through a denaturing polyacrylamide gel, transferred to a PVDF membrane and incubated with antibodies against CI-39kDa and SDH-Fp (succinate dehydrogenase-flavoprotein subunit). After autoradiography the bands were quantified by densitometry. A decreased expression of CI-39kDa was found in 6 % of the cases with a possible or probable diagnosis of mitochondrial disease. Sequencing studies demonstrated only one abnormality: a not yet

described missense mutation in *NDUFV2*. Our results show that: (1) the frequency of a decreased expression in CI-39kDa was low in the studied cases with a suspicion of mitochondrial disease; (2) molecular studies of these cases showed that mutations in mtDNA encoded genes and known mutations in nuclear encoded genes for complex I subunits were not the cause of the defects observed in these patients; (3) the mutation in *NDUFV2* can be the cause of a complex I defect, but further investigations are still needed to confirm its pathogenicity. Confirmation of the utility of this method for the diagnosis of complex I deficiency will probably be achieved by a continuation of this study.