



• U

C •

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Investigação do gene *TWINKLE* em
casos de deleções múltiplas do mtDNA

Vera Lúcia da Silva Baptista

2011



U

C

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Investigação do gene *TWINKLE* em casos de deleções múltiplas do mtDNA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Investigação Biomédica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Grazina (Universidade de Coimbra)

*Copyright©, 2011 todos os direitos reservados,
Vera Baptista e Manuela Grazina*

Vera Lúcia da Silva Baptista

2011

Laboratório de Bioquímica Genética (LBG), Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) – Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)

Agradecimentos

A realização desta dissertação, a fim de obter o grau de Mestre em Investigação Biomédica, só foi possível graças a um grupo de intervenientes que demonstraram muito empenho, aos quais deixo aqui os meus solenes cumprimentos e agradecimentos:

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Manuela Grazina a orientação científica do presente trabalho que decorreu no Instituto de Bioquímica da Faculdade de Medicina, laboratório de Bioquímica Genética - Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra. Obrigada pela atenção, disponibilidade, preocupação e carinho com que sempre me tratou. Agradeço também o facto de me ter ajudado a crescer cientificamente e a nível pessoal;

Ao Doutor Filipe Silva por tudo o que me ensinou, pela paciência, ajuda, preocupação e atenção que teve para comigo;

À Professora Doutora Catarina Resende, pela oportunidade de integrar o CNC/UC e o Instituto de Bioquímica, FMUC;

À Carolina Ribeiro e à Daniela Luís, por tudo o que me ensinaram e pela amizade;

Ao Dr. João Pratas pela ajuda e atenção que teve para comigo;

À restante equipa e colaboradores do laboratório de Bioquímica e Genética pelo apoio mostrado na realização do trabalho experimental;

A todos os meus amigos, especialmente a Catarina, Teresa, Carla e Ana, que me apoiaram e incentivaram a alcançar este objectivo;

E, em especial aos meus pais, irmã e ao André pelo apoio que sempre me deram em todas as decisões da minha vida;

A todos o meu muito sincero, Obrigada!

Índice

Listagens de Figuras	vi
Listagem de Tabelas	vii
Abreviaturas	viii
Resumo.....	xii
Abstract	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. Mitocôndria	2
1.2. DNA mitocondrial (mtDNA).....	5
1.3. Mutações no mtDNA e Citopatias mitocondriais.....	8
1.4. Gene <i>TWINKLE</i> e deleções do mtDNA	15
2. Objectivos	19
3. Material e Métodos	21
3.1. Amostragem	22
3.2. Amplificação dos exões do gene <i>TWINKLE</i>.....	24
3.2.1. Amplificação genética por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	24
3.3. Electroforese em gel de agarose	27
3.4. Purificação dos produtos de PCR	28
3.5. PCR de Sequenciação.....	29
3.6. Purificação dos produtos para electroforese de Sequenciação ...	29

3.7. Sequenciação automática.....	29
3.8. Análise das sequências.....	31
3.9. Análise <i>in Silico</i>	32
4. Resultados.....	33
4.1. Análise da sequência genética do gene <i>TWINKLE</i>	34
4.2. Frequências genóticas e alélicas.....	39_Toc304149410
5. Discussão.....	43
6. Conclusões.....	49
7. Referências Bibliográficas.....	51

Listagens de Figuras

Figura 1- Características da cadeia respiratória mitocondrial	3
Figura 2 – Representação esquemática da mitocôndria e vias metabólicas.....	4
Figura 3 – Representação esquemática do genoma.....	7
Figura 4 – Modelos propostos para explicar os mecanismos moleculares de formação das deleções do mtDNA.....	11
Figura 5 - Genes envolvidos nas deleções múltiplas e/ou nas depleções do mtDNA.....	14
Figura 6 – Diferentes isoformas do gene <i>TWINKLE</i>	16
Figura 7 – Representação esquemática do gene <i>TWINKLE</i> e das mutações que causam doença.	17
Figura 8 – Representação esquemática das fases da PCR.....	26
Figura 9 – Exemplo de uma sequência, resultado da sequenciação automática.	31
Figura 10 – Amplificações de amostras em cada um dos exões.	35
Figura 11 - Electroferograma da alteração IVS2-253DelATGGCA encontrado na análise do exão 3.	38
Figura 12 – Electroferograma relativo às alterações IVS3-5C>T e IVS3-3T>C, em heterozigotia, no intrão 3.....	39
Figura 13 – Electroferograma relativo à alteração IVS4-202G>A, em heterozigotia, no intrão 4.....	39
Figura 14 - Distribuição (%) dos doentes com e sem alterações encontradas no gene <i>TWINKLE</i>	41
Figura 15 - Homozigotia vs. Heterozigotia (%) das alterações genéticas encontradas no gene <i>TWINKLE</i>	41

Listagem de Tabelas

Tabela I – Doenças humanas associadas às deleções múltiplas no mtDNA.	15
Tabela II – Mutações descritas do gene TWINKLE.	18
Tabela III – Apresentação Clínica dos doentes em estudo.....	23
Tabela IV – Componentes da mistura da PCR	27
Tabela V – Alterações encontradas correspondentes a cada doente.....	36
Tabela VI – Descrição das alterações encontradas na análise dos exões 3, 4 e 5.....	40
Tabela VII – Alterações encontradas para cada uma das diferentes isoformas.	42

Abreviaturas

µl	Microlitro
A	Adenina
ADP	Adenosina difosfato (em inglês: <i>Adenosine Diphosphate</i>)
adPEO	Oftalmoplegia externa progressiva autossômica dominante (em inglês: <i>Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia</i>)
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina (em inglês: Adenine nucleotide translocator)
ANT1	Gene codificante do ANT
ATP	Adenosina trifosfato (em inglês: <i>Adenosine Triphosphate</i>)
ATP6	Subunidade 6 da F1F0 ATP sintase
ATP8	Subunidade 8 da F1F0 ATP sintase
C	Citosina
COX	Citocromo c oxidase, complexo IV da CRM
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
ddNTP's	Didesoxinucleótidos trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (em inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleico
FADH	Flavina adenina dinucleótido reduzida (em inglês: <i>Flavin adenine</i>)

	<i>dinucleotide)</i>
G	Guanina
H₂	Hidrogénio
H₂O	Água
HC	Cadeia de DNA mitocondrial pesada
IOSCA	Ataxia espinocerebelar de início Infantil (em inglês: <i>Infantile-onset spinocerebellar ataxia</i>)
LC	Cadeia de DNA mitocondrial leve
LHON	Neuropatia óptica hereditária de Leber (em inglês: <i>Leber Hereditary Optic Neuropathy</i>)
MELAS	Miopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios semelhantes a AVC (em inglês: <i>Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes</i>)
MEM	Membrana externa mitocondrial
MERF	Epilepsia mioclónica com fibras vermelhas rasgadas (em inglês: <i>Myoclonic Epilepsy, Ragged Red Fibers</i>)
MILS	Síndrome de Leigh de transmissão materna
MIM	Membrana interna mitocondrial
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial (em inglês: <i>Mitochondrial DNA</i>)
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida

NARF	Neuropatia, ataxia e retinite pigmentar (em inglês: <i>Neurophathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa</i>)
nDNA	DNA nuclear
NQR	NADH desidrogenase - coenzima Q redutase, complexo I da CRM
O₂	Oxigénio
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PCR	Reacção da polimerase em cadeia (em inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEO	Oftalmoplegia externa progressiva (em inglês: <i>Progressive external oftalmoplegia</i>)
Pi	Fosfato
POLG	Gene que codifica a subunidade catalítica da polimerase gama específica do mtDNA
QCCR	Coenzima Q – citocromo c redutase, complexo III da CRM
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (em inglês: <i>Reactive oxygen species</i>)
rRNA	RNA ribossomal
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SQDR	Succinato desidrogenase – coenzima Q redutase, complexo II da CRM
T	Timina
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (em inglês: <i>Tricarboxylic cycle acids</i>)
TFAM	Factor de transcrição A mitocondrial (em inglês: <i>Transcription factor A,</i>

	<i>mitochondrial)</i>
tRNA	RNA de transferência
TWINKLE	Gene que codifica a proteína helicase, que regula o enrolamento e a estabilidade da estrutura do mtDNA (também denominado de <i>PEO1</i> ou <i>C10Orf2</i>)
UV	Ultravioleta

Resumo

As citopatias mitocondriais representam um grupo heterogéneo de doenças multissistémicas. De acordo com os estudos epidemiológicos disponíveis, prevê-se que, pelo menos uma em cada 8.000 pessoas sofra ou esteja em risco de ter uma doença da cadeia respiratória mitocondrial.

As mitocôndrias são organelos responsáveis pela produção de energia e contêm o seu próprio genoma, o DNA mitocondrial (mtDNA). Em todos os seres eucariotas, a formação e actividade da cadeia respiratória mitocondrial está sob o controle de dois sistemas genéticos, o genoma nuclear e o mitocondrial. A função mitocondrial é totalmente dependente da coordenação e cooperação de ambos os genomas.

O mtDNA possui uma taxa de mutação muito elevada; no entanto, a disfunção mitocondrial pode ser resultado de mutações em qualquer um dos dois genomas.

Das alterações genéticas patogénicas do mtDNA, as deleções estão entre as mutações mais frequentes, em particular as deleções múltiplas, que estão associadas a mutações em genes nucleares que afectam a biogénese, replicação ou estabilidade do mtDNA. De entre vários genes nucleares identificados associados a fenótipos clínicos causados por deleções do mtDNA, está o gene *TWINKLE*. Mutações neste gene foram identificadas em casos de deleções múltiplas.

O gene *TWINKLE* codifica uma proteína hexomérica, helicase 5' – 3' do mtDNA e é responsável pelo seu desenrolamento na replicação.

O objectivo deste trabalho é a investigação do gene *TWINKLE* e a sua associação a deleções múltiplas do mtDNA em casos de citopatias mitocondriais com envolvimento muscular e oftalmológico (p. ex. oftalmoplegia externa progressiva).

Os resultados não permitiram identificar mutações patogénicas na região codificante ou adjacente. Deste modo poderão existir mutações noutros genes relacionados com as deleções múltiplas do mtDNA nos casos estudados.

No entanto, este estudo representa um grande contributo para a implementação do diagnóstico genético no Laboratório de acolhimento e permitiu excluir as mutações exoma do gene *TWINKLE* como causa das doenças em 23 doentes.

Abstract

Mitochondrial cytopathies represent a heterogeneous group of multisystem diseases. According to the available epidemiological studies, it is estimated that at least one in 8.000 people suffer from or are at risk of having a mitochondrial disorder.

Mitochondria are organelles responsible for energy production and contain their own genome, mitochondrial DNA (mtDNA). In all eukaryotes the formation and activity of the respiratory chain (CRM) is under the control of two genetic systems, the nuclear and mitochondrial genome. The mitochondrial function is entirely dependent on the coordination and cooperation of both genomes.

The mtDNA has a very high mutation rate, however mitochondrial dysfunction can result from mutations in any of those two genomes.

Of all From pathogenic mtDNA genetic alterations, deletions are among the most frequent mutations, particularly multiple ones which are associated with nuclear genes affecting biogenesis, replication or mtDNA stability. Among several identified nuclear genes associated to clinical phenotypes caused by mtDNA deletions, there is the *TWINKLE* gene in which mutations were already identified in cases of multiple deletions.

TWINKLE gene encodes a hexameric protein, helicase 5' – 3' of mtDNA, and is responsible for its unwinding in the replication process.

This work's main objective is the investigation of the *TWINKLE* gene and its association with multiple mtDNA deletions in cases of mitochondrial cytopathies which muscle and eye involvement (eg. Progressive external ophthalmoplegia).

Results did not allow the identification of pathogenic mutations in the encoding or adjacent regions. Therefore mutations on other genes may probably be related to multiple mtDNA's deletions in the studied cases.

This study represents a major contribution to the implementation of genetic diagnosis in the laboratory host and allowed the exclusion of exome mutations on the *TWINKLE* gene as a cause of all 23 patients' diseases.

1. Introdução

1.1. Mitocôndria

As mitocôndrias encontram-se em todas as células nucleadas e são organelos responsáveis pela produção de energia. Estão presentes em quase todas as células eucarióticas, em quantidades que variam de uma única cópia para vários milhares por célula (Taylor & Turnbull, 2007; Desler *et al.*, 2010).

Quando as células se dividem, as mitocôndrias são distribuídas quase igualmente entre as células filhas. Estes organelos possuem uma membrana externa (MEM) e uma membrana interna (MIM), separadas pelo espaço intermembranar (Mao & Holt, 2009). A MEM é lisa, esférica e muito permeável, contendo muitos poros permeáveis a pequenas moléculas. Em contraste, a MIM é impermeável às moléculas mais pequenas e iões, uma propriedade necessária para a manutenção de um gradiente electroquímico. A MIM apresenta numerosas dobras, conhecidas por cristas, geralmente perpendiculares ao eixo longitudinal da mitocôndria e que delimitam, respectivamente, o espaço intermembranar e o espaço intra-mitocondrial (Grazina, 2004; Mao & Holt, 2009). Estima-se que três quartos da massa da MIM são proteínas pertencentes ao sistema da cadeia respiratória mitocondrial (CRM), onde ocorre o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS). O compartimento interior da mitocôndria é composto por uma substância gelatinosa, a matriz, que contém muitas enzimas, incluindo as do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e da β -oxidação. Estima-se que a mitocôndria contém cerca de 1000 proteínas, dos quais apenas 3 a 32, dependendo do organismo, são codificadas pelo genoma mitocondrial (mtDNA). As restantes são codificadas pelo DNA nuclear (Mao & Holt, 2009).

A mitocôndria está envolvida na homeostasia celular, tendo um importante papel na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteróides e nucleótidos, entre outros. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético (Wallace, 2010).

No organismo humano, o mtDNA codifica 37 genes necessários para a função de componentes da CRM. A CRM é constituída por cinco complexos multi-enzimáticos (complexo I: NADH desidrogenase ou NADH - coenzima Q redutase, NQR; complexo II: succinato desidrogenase ou succinato – coenzima Q redutase, SQDR; complexo III: coenzima Q – citocromo c redutase, QCCR; complexo IV: citocromo oxidase, COX; complexo V: ATP sintetase, ATPase) e dois transportadores de electrões (ubiquitina e citocromo c), que estão localizados na membrana interna da mitocôndria e formam o sistema onde ocorre a OXPHOS. Esta via metabólica é responsável pela maior parte do ATP celular em condições aeróbias (Figura 1) (Grazina, 2004; Wong, 2005; Desler, Lykke & Rasmussen, 2010; Wallace, 2010).

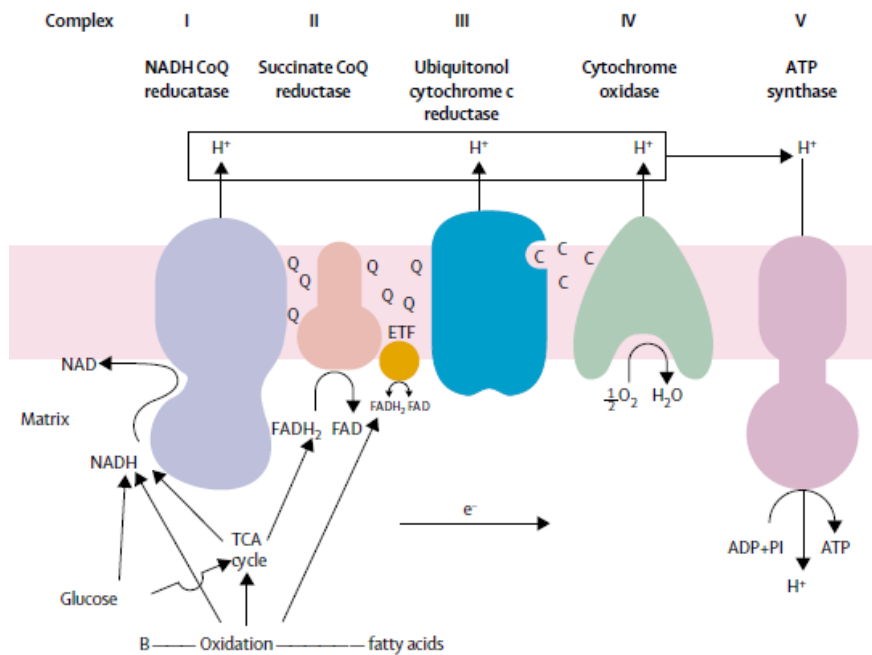


Figura 1- Características da cadeia respiratória mitocondrial

A função global da cadeia respiratória é a oxidação de nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzida (NADH) e flavina-adenina dinucleótido reduzida (FADH₂), provenientes de outras vias metabólicas, bem como o transporte de equivalentes reduzidos ao longo de uma série de transportadores para o aceitador final, o oxigénio (Schapira, 2006).

A oxidação completa de uma molécula de glicose a CO_2 produz cerca de 38 moléculas de ATP (Grazina, 2004). A via de OXPHOS, sendo o mecanismo final de todas as vias metabólicas para a produção de energia, participa na sua regulação e, portanto qualquer déficit na CRM tem consequências noutros metabolismos. (Wallace, 2010). Em geral, as vias metabólicas que dão origem à produção de ATP são reguladas de forma coordenada (Figura 2) (Grazina, 2004).

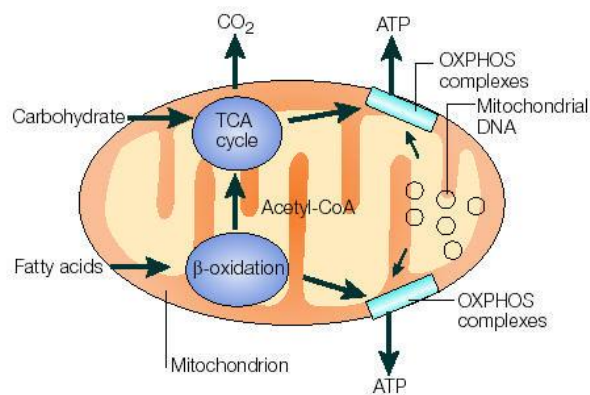


Figura 2 – Representação esquemática da mitocôndria e vias metabólicas (Taylor & Turnbull, 2007).

As vias catabólicas de maior importância têm mecanismos interligados e ajustados, que permitem o seu funcionamento em conjunto, de um modo económico e auto-regulador, para produzir ATP e precursores de biossíntese. As concentrações relativas de ATP e ADP controlam, não só as taxas de transferência de electrões e da OXPHOS, bem como a oxidação do piruvato, e Glicólise. Sempre que o consumo de ATP aumenta, a taxa de transferência de electrões/ OXPHOS também aumenta. De facto, as vias metabólicas estão interligadas de uma forma coordenada e a ocorrência de alterações em uma delas, leva, inevitavelmente, a que ocorram, secundariamente, alterações nas outras vias. O processo de OXPHOS é o culminar de uma série de

reações bioquímicas para a formação de energia pelo metabolismo, em organismos aeróbios. Todos os passos oxidativos, na degradação de hidratos de carbono, gorduras e aminoácidos convergem, nesta fase final de respiração celular, na qual a energia de oxidação conduz à síntese de ATP (Grazina, 2004).

O oxigénio (O_2) é um elemento essencial à vida, nomeadamente ao processo de obtenção de energia por parte das células. No entanto, em determinadas condições, incluindo uma disfunção da CRM, pode surgir como um elemento agressor. Em mitocôndrias funcionais, o transporte de electrões está acoplado à síntese de ATP e o O_2 é maioritariamente reduzido a H_2O ao nível da COX, mas cerca de 1-4 % do O_2 , não é completamente reduzido, dando, assim, origem às ROS (espécies reactivas de oxigénio). Estas podem surgir em vários locais da célula, principalmente ao nível da semi-ubiquinona, na CRM. O mtDNA lesado origina subunidades da CRM anormais, comprometendo a integridade do processo de OXPHOS, nomeadamente, a síntese de ATP. Em mitocôndrias que expressam mutações induzidas por oxidação, aumenta a formação de ROS e/ou há um decréscimo no potencial para a fosforilação oxidativa, numa sequência de eventos que podem levar à morte celular, constituindo um dos principais mecanismos subjacentes ao envelhecimento e com particular relevância nas doenças neurodegenerativas (Grazina, 2004).

É, portanto, concebível que defeitos em qualquer um dos 1500 genes, codificados por ambos os genomas (mitocondrial e nuclear), necessários à formação e funcionamento da CRM normal, são potencialmente prejudiciais para a estrutura e função mitocondrial (Wong, 2010).

1.2. DNA mitocondrial (mtDNA)

A mitocôndria contém o seu próprio genoma, que codifica 13 polipeptídeos da CRM (7 subunidades do complexo I, o citocromo *b*, que faz parte do complexo III, 3

peptídeos do complexo IV e 2 subunidades do complexo V) e 24 RNAs (2 rRNAs e 22 tRNAs), necessários para a síntese proteica mitocondrial (Figura 3) (Taylor & Turnbull, 2007; Pacheu-Grau *et al.*, 2010; Desler, Lykke & Rasmussen, 2010). O mtDNA possui o seu próprio código genético, diferente do genoma nuclear, sendo regulado por um sistema semiautónomo, em que a replicação e a transcrição dependem de factores de origem nuclear, como por exemplo a DNA polimerase gama, estando as sequências reguladoras essenciais localizadas no *D-loop* (Zeviani & Antozzi, 1997; Grazina, 2004).

Em todos os seres eucariotas, a formação e actividade da CRM está sob o controle de dois sistemas genéticos, o genoma nuclear (nDNA) e o mitocondrial, mtDNA. As mitocôndrias contêm múltiplas cópias do mtDNA, em número variável consoante o tipo celular, estimando-se que existam cerca de 10^3 - 10^6 cópias em todas as células do organismo humano (Spinazzola & Zeviani, 2009).

O mtDNA é dependente de factores, codificados por genes nucleares, necessários para a sua replicação, expressão e manutenção. O mtDNA humano é uma molécula circular, com 16,568 pb, de cadeia dupla fechada (cadeia leve - LC e cadeia pesada - HC), devendo a sua denominação ao conteúdo em desoxiribonucleótidos de guaninacitosina, mais elevado na HC (Mao & Holt, 2009).

No mtDNA, praticamente não existem intrões; existe uma região não-codificante com cerca de 1,1 kb, que contém sequências de replicação, incluindo os promotores da transcrição. Esta região, *D-loop*, está localizada entre os nucleótidos nas posições 16024-576, contendo um fragmento da HC em tripla cadeia (DNA 7S), que se encontra ligado de forma complementar à LC (Grazina, 2004).

A função mitocondrial é, portanto, totalmente dependente da coordenação e cooperação de ambos os genomas, podendo a disfunção mitocondrial ser o resultado de mutações no genoma mitocondrial ou no genoma nuclear (Greaves & Taylor, 2006; Desler, Lykke & Rasmussen, 2010).

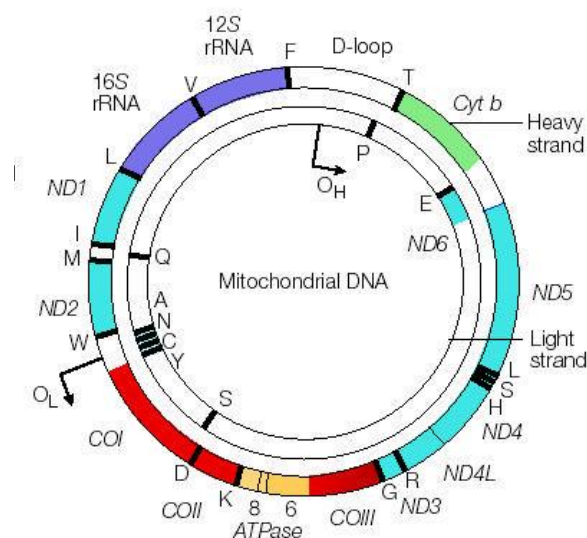


Figura 3 – Representação esquemática do genoma.

Mapa do genoma humano mitocondrial. Os genes que codificam as subunidades do complexo I (*ND1*, *ND6* e *ND4L*) são mostrados a azul; o citocromo *c* oxidase (*COI-COIII*) é mostrado a vermelho; o citocromo *b* do complexo III é mostrado a verde; e as subunidades da sintase de ATP (ATPase 6 e 8) são mostradas a amarelo. Os dois rRNAs (12S e 16S) são mostrados a roxo e os 22tRNAs são indicados com linhas a preto com o respectivo código de uma única letra correspondente ao aminoácido. A região *D-loop*, não codificante, contém sequências que são vitais para o início de replicação e da transcrição do DNA mitocondrial, incluindo a origem da replicação da cadeia pesada (*OH*) e a origem da replicação da cadeia leve (*OL*) mitocondrial (Taylor & Turnbull, 2007).

O conteúdo DNA mitocondrial dentro dos tecidos está relacionado com as suas necessidades energéticas. Os tecidos com maior gasto de energia são os músculos, fígado, cérebro e pâncreas (Mao & Holt, 2009).

O mtDNA tem também outras características particulares. A hereditariedade do mtDNA ocorre por via materna (Verge, 2011). De facto, apesar de algumas mitocôndrias do espermatozóide penetrarem no óvulo durante o processo de fecundação, elas são depois selectivamente destruídas, por razões ainda desconhecidas. A sequência do mtDNA é codificante quase na sua totalidade, o que

pode ser uma vantagem, tendo em conta o “empacotamento económico” deste genoma. Por outro lado, pode constituir uma desvantagem, quando se tem em conta a elevada taxa de mutações, relativamente ao nDNA (10-20 vezes superior), uma vez que possui maioritariamente sequências codificantes, a probabilidade de uma alteração ser mais lesiva é muito superior (Grazina, 2004).

1.3. Mutações no mtDNA e Citopatias mitocondriais

Os sistemas de reparação do DNA mitocondrial, são insuficientes para neutralizar o dano oxidativo a que o genoma mitocondrial está exposto, dada a sua proximidade ao local de produção maioritário de espécies reactivas de oxigénio, bem como à ausência de histonas protectoras (Tuppen *et al.*, 2010).

O papel das mutações no mtDNA em fenótipos de doenças mitocondriais tem sido reconhecido desde há muitas décadas (Greaves & Taylor, 2006).

A maioria das alterações do mtDNA descritas são polimorfismos neutros. As primeiras mutações do mtDNA patogénicas foram descritas nos anos 80 (Holt *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1988). Desde então, mais de 250 mutações no DNA mitocondrial patogénicas (mutações e rearranjos) foram identificadas, associadas a uma grande variedade de patologias, com idade de início variável de uma grande heterogeneidade de fenótipos, como MELAS (Miopatia Mitocondrial, Acidose Láctica e episódios tipo a AVC), MERRF (Epilepsia Mioclónica com fibras vermelhas rasgadas), NARP (neuropatia ataxia e retinite pigmentar), MILS (Síndrome de Leigh de hereditariedade materna), e LHON (Neuropatia óptica hereditária de Leber), entre outros (Grazina, 2004; Schapira, 2006; Tuppen *et al.*, 2010). Um exemplo clássico é a diabetes *mellitus*, que apresenta frequentemente uma associação com outros fenótipos, incluindo a surdez e a miopatia (Greaves & Taylor, 2006).

As alterações patogénicas do mtDNA podem ser classificadas em: (i) mutações pontuais; (ii) rearranjos (deleções/duplicações/inserções, isoladas ou múltiplas) e (iii) redução drástica do número de cópias de mtDNA (depleção) (Zeviani & Antozzi, 1997; Grazina, 2004). As mutações pontuais descritas são, geralmente, herdadas e são principalmente heteroplásmicas. Elas podem originar substituições de aminoácidos ou afectar a proteína, tRNA ou rRNA. No entanto, mais de metade das mutações relacionadas com doenças mitocondriais estão localizadas dentro de genes do tRNA (Grazina, 2004; Tuppen *et al.*, 2010).

As mutações em genes nucleares que codificam componentes estruturais da CRM ou factores envolvidos na sua montagem (*assembly*) podem levar a fenótipos clínicos semelhantes às mutações do mtDNA. No entanto, as mutações seguem uma transmissão mendeliana, em vez de um padrão de herança materna (Mao & Holt, 2009).

As deleções do genoma mitocondrial foram das primeiras mutações do mtDNA descritas, associadas a doenças humanas. O tamanho da deleção pode variar de uma única base a milhares de bases e estar localizado em qualquer parte da molécula, atingindo vários genes (Schapira, 2006; Tuppen *et al.*, 2010).

O mecanismo de formação das deleções do mtDNA ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, já foram propostos vários modelos para explicar a origem das deleções do mtDNA. Um *crossing over* intergenómico desigual e desemparelhamento de bases complementares durante a replicação de DNA, são mecanismos alternativos propostos para as duplicações e deleções (Hirano *et al.*, 2001).

Existem dois modelos propostos (figura 4): *slip-replication* e *illegitimate elongation*. De acordo com o modelo de *slip-replication*, proposto por Shoffner e colaboradores (Shoffner *et al.*, 1989), a cadeia molde simples H emparelha inadequadamente com a cadeia complementar L, nas sequências repetitivas, o que produz um segmento de DNA, que, eventualmente é perdido (Figura 4(b)- (e)). Os dois fragmentos de cadeias H devem ser ligados para transformar uma molécula com

deleção da cadeia H para uma cadeia L. A hipótese da *illegitimate elongation* foi originalmente descrita por Buroker e colaboradores (Buroker *et al.*, 1990), para explicar as sequências heteroplásmicas *D-loop* do mtDNA. Estas alterações são devidas a um número variável de 82 pares de bases que se repetem (Figura 4(f)-(i)). Neste modelo, a elongação da cadeia *D-loop* é deslocada pela migração do ramo da cadeia mãe H, que forma pares bases com complementaridade da cadeia L e permite que a cadeia *D-loop* seja libertada para se sobrepor e desalinhar as sequências repetidas (Figura 4(f)-(i)). O desalinhamento das sequências com repetições é facilitada pelas estruturas secundárias estáveis que produzem a cadeia H (Figura 3(i)). Ambos os modelos (*slip-replication* e *illegitimate elongation*) são compatíveis com o conceito de que os desequilíbrios dos nucleotídeos podem induzir deleções múltiplas do mtDNA (Hirano *et al.*, 2001).

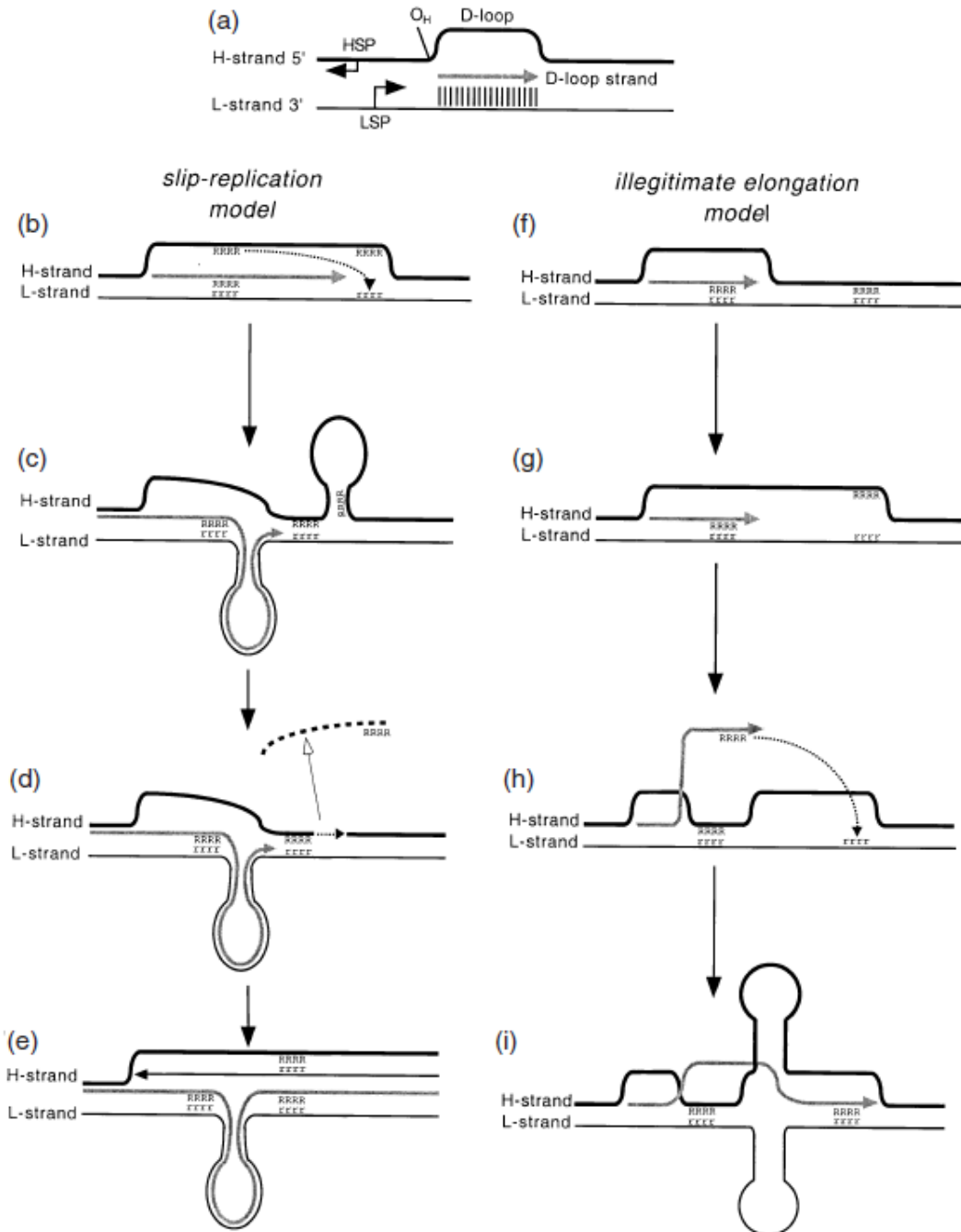


Figura 4 – Modelos propostos para explicar os mecanismos moleculares de formação das deleções do mtDNA. (a) estrutura normal do D-loop; (b) - (e) modelo *slip-replication*; (f) - (i) – modelo *illegitimate elongation*; RRRR (cadeia H) e rrrr – (Ccadeia L) representam as sequências de repetições (Hirano *et al.*, 2001).

A ocorrência de deleções múltiplas do mtDNA, de tamanhos variados, em tecidos afectados pode ser devido a mutações hereditárias em genes nucleares, cujos

produtos estão envolvidos na manutenção e replicação do mtDNA (por exemplo, *POLG* e *PEO1* que codifica a proteína *twinkle*). Apesar das mutações terem origens diferentes, a maioria partilham características comuns. Estas ocorrem principalmente entre as origens de replicação, OH e OL, e normalmente são flanqueadas por sequências repetitivas, existindo diversas regiões “*Hot Spot*” e sequências que são poupadas, possivelmente por serem vitais (Grazina, 2004; Tuppen *et al.*, 2010).

As deleções afectam, geralmente, múltiplas enzimas da CRM, porque atingem as sequências codificantes de vários genes estruturais e tRNA's (Grazina, 2004). A ocorrência de uma variedade de deleções é, sobretudo, em maioria esporádica, em heteroplasmia, e resulta sempre na perda de um ou mais genes tRNA, afectando, portanto, a tradução dos 13 genes mitocondriais que codificam polipeptídeos da CRM. Estas deleções do mtDNA são, invariavelmente, encontradas no músculo esquelético, mas estão muitas vezes ausentes no sangue. A evolução clínica dos doentes com estas alterações é muito variável; o início pode variar desde o nascimento até à idade adulta tardia (> 60 anos) (Mao & Holt, 2009).

As doenças mitocondriais associadas às deleções múltiplas do mtDNA são geralmente autossómicas dominantes e ocorrem mais frequentemente na idade adulta. As deleções variam de tamanho e de localização no mtDNA de um indivíduo para outro, mesmo sendo da mesma família (Sarzi & Rötig, 2010).

Em 1988, a identificação por Holt e colaboradores (Holt *et al.*, 1988) de deleções em grande escala em doentes com miopatias mitocondriais, abriu um novo campo de investigação na Genética Humana, o que levou ao reconhecimento da oftalmoplegia externa progressiva autossómica dominante (*adPEO*), a primeira doença “intergenómica”.

Em 1989, a presença de deleções múltiplas do mtDNA foi detectada em amostras de músculo de dois irmãos com *PEO*, atrofia óptica, fraqueza muscular e neuropatia periférica. No entanto, em contraste com as famílias autossómicas dominantes, os dois irmãos eram os únicos membros afectados; os pais eram

consanguíneos e aparentemente saudáveis. O modo de transmissão de hereditariedade sugerido foi autossômico recessivo (Yuzak *et al.*, 1989). Desde então, as deleções múltiplas do mtDNA têm sido identificadas em numerosos casos esporádicos de *PEO*. Os doentes com *PEO* autossômica recessiva apresentam um início da doença na infância, fraqueza muscular facial ligeira e proximal, com miocardiopatia grave, necessitando de transplante cardíaco (Spinazzola & Zeviani, 2005).

Enquanto a síndrome de *adPEO* é antes de mais uma patologia do músculo, doenças autossômicas recessivas com deleções múltiplas do mtDNA são mais comuns e incluem a oftalmoplegia e cardiomiopatia autossômica recessiva (*ARCO*) e ataxia, neuropatia, disartria e oftalmoplegia (*SANDO*). Apesar da heterogeneidade clínica das doenças autossômicas associadas a deleções múltiplas do mtDNA, o músculo esquelético, particularmente o músculo extraocular é consideravelmente afectado. Como o nome implica, *adPEO* é clinicamente caracterizada por oftalmoplegia externa progressiva e história familiar compatível com transmissão autossômica dominante (Hirano *et al.*, 2001; Negro *et al.*, 2009).

As características clínicas da doença no heredograma original italiano (Servidei *et al.*, 1991) incluem: idade de início entre 24-30 anos, ptose, disfagia, disfonia, fraqueza facial e dos membros, cataratas, intolerância ao exercício e morte na meia idade (43-59 anos). Muitos doentes com deleções múltiplas do mtDNA, têm falta de segmentos de mtDNA no arco principal entre OH e OL, sendo a maioria das supressões rodeadas por repetições de sequências directas. No entanto, em contraste das deleções simples do mtDNA, a maioria das deleções múltiplas em indivíduos idosos e em doentes com *adPEO* e miopatia com corpos de inclusão, apresentam um ponto de interrupção perto da região *D-loop* (Hirano *et al.*, 2001).

Tendo em conta os factores necessários para a replicação, transcrição, biogénese e estabilidade do mtDNA (Figura 5), foram já identificados vários genes nucleares, que codificam factores com função a estes níveis, com mutações

associadas a fenótipos causados por deleções múltiplas do mtDNA (tabela I) (Grazina, 2004).

Existem três *loci* descritos no genoma nuclear associados a *adPEO*: 4q34-35, 10q24 e 15q22-q26. O estudo detalhado destas regiões levou à identificação de mutações nos genes *ANT1*, *TWINKLE* e *POLG*, localizados no genoma nuclear (Hirano *et al.*, 2001).

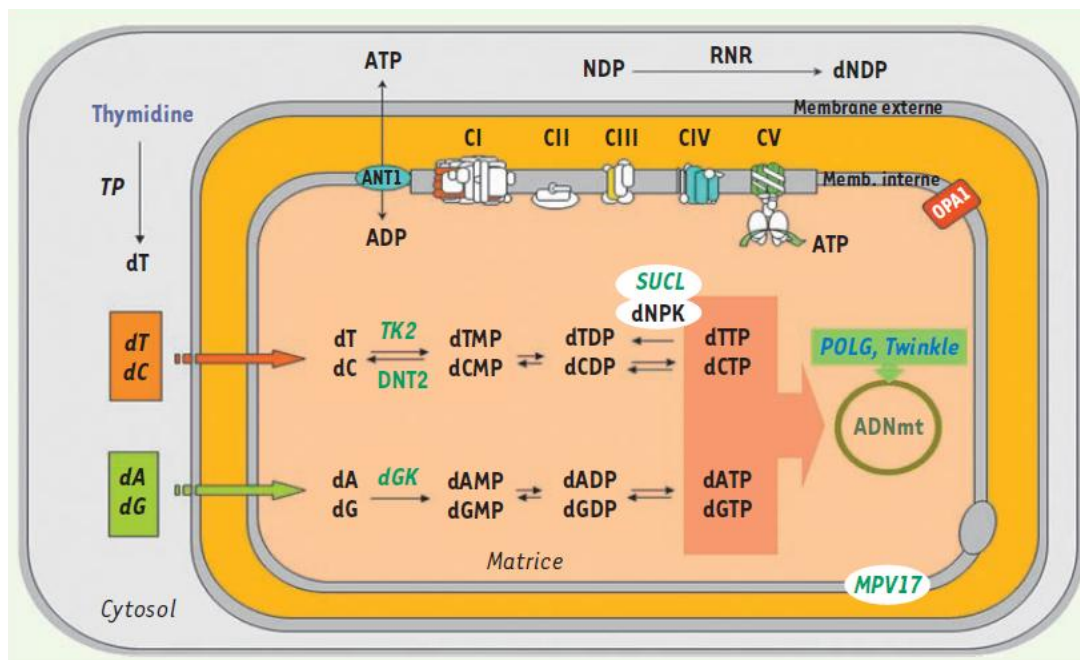


Figura 5 - Genes envolvidos nas deleções múltiplas e/ou nas depleções do mtDNA.

CI, CII, CIII, CIV e CV: Complexo I, II, IV e V da cadeia oxidativa mitocondrial; dT, dC, dA, dG: desoxitimidina, desoxicitosina, desoxiadenosina, desoxiguanosina; dTMP, dCMP, dAMP, dGMP: desoxinucleotídeos monofosfato; dTDP, dCDP, dADP, dGDP: desoxinucleotídeos difosfato; dTTP, dCTP, dATP, dGTP: desoxinucleotídeo trifosfato (Sarzi & Rötig, 2010).

Tabela I – Doenças humanas associadas às deleções múltiplas no mtDNA
(Adaptado de Hirano *et al.*, 2001).

Doença	Loci Cromossomal	Gene
Autossômica dominante		
Ophthalmoplegia dominante externa progressiva	4q34-35	<i>ANT1</i>
	10q24	<i>TWINKLE</i>
	15q22-q26	<i>POLG 1,2</i>
Encefalomiopatia progressiva	Desconhecido	Desconhecido
Cardiomiopatia dilatada	Desconhecido	Desconhecido
Miopatia mitocondrial	Desconhecido	Desconhecido
Autossômica recessiva		
Oftalmoplegia cardiomiopatia autossômica recessiva (ARCO)	Desconhecido	Desconhecido
Encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)	22q13.32-qter	<i>TK2</i>
Síndrome Wolfram	4p16	<i>WFS1</i>

1.4. Gene *TWINKLE* e deleções do mtDNA

A “twinkle” é uma proteína hexomérica helicase 5’–3’ do mtDNA, codificada pelo gene *C10orf2* (*chromosome 10 open reading frame 2*), também denominado *PEO1* ou *TWINKLE*. Esta proteína é responsável pelo desenrolamento das cadeias na replicação do mtDNA (Schapira, 2006).

A proteína “twinkle” contém três domínios funcionais: uma região helicase 3’, uma região “*linker*”, envolvida na oligomerização de um hexâmero necessário para a actividade da helicase, e um domínio primase 5’ (Região N-terminal) (Van Hove *et al.*, 2009). A região N-terminal é pouco conservada, mas contém vários domínios primase, incluindo os “*motifs*” II, III, IV e VI, que são altamente conservados (Spelbrink *et al.*, 2001; Van Hove *et al.*, 2009).

Em 2001, o gene *TWINKLE* foi estudado em busca de associações com deleções múltiplas, no entanto observou-se que a região C-terminal da proteína *twinkle* era semelhante à sequência da primase/helicase T7 (proteína do gene 4, gp4), necessária para a replicação do DNA bacteriófago (Spelbrink *et al.*, 2001). A proteína do gene 4 codificada pelo bacteriófago T7 consiste em dois domínios, helicase e primase, localizados nas metades C-terminal e N-terminal da proteína, respectivamente (Satapathy *et al.*, 2009).

O gene *TWINKLE* foi originalmente identificado no cromossoma 10q24.31 e existem quatro isoformas conhecidas actualmente (Figura 6) (Korhonen *et al.*, 2003).

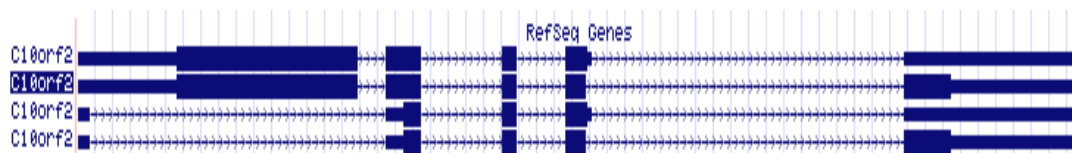


Figura 6 – Diferentes isoformas do gene *TWINKLE* (Adaptado de Kent *et al.*, 2002).

O gene *TWINKLE* interage aproximadamente com 20 proteínas, incluindo a polimerase gama, TFAM e proteínas de ligação simples do mtDNA. Em particular, o *TWINKLE* tem uma interacção funcional com a subunidade β da POLG que é estimulada pelas proteínas de ligação simples do mtDNA, que formam uma unidade

de replicação do mtDNA. Essas interações funcionais podem explicar a similaridade de fenótipos clínicos que pode ocorrer devido a deficiências genéticas e qualquer um dos genes que codificam os factores desta unidade (Van Hove *et al.*, 2009).

A maioria das mutações descritas em doentes está localizada principalmente nas regiões “*linker*” ou helicase (figura 7) (Van Hove *et al.*, 2009).

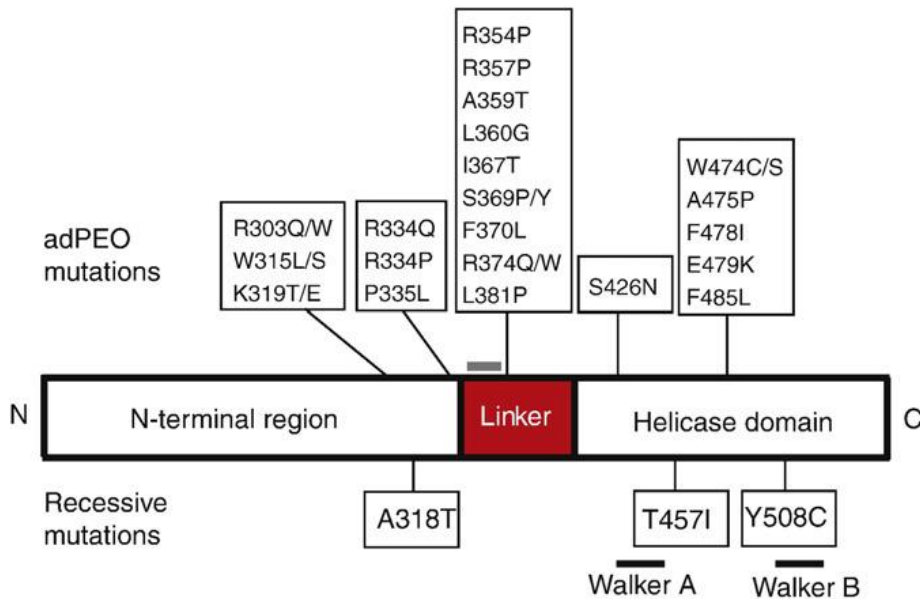


Figura 7 – Representação esquemática do gene *TWINKLE* e das mutações que causam doença (Adaptado Wanrooij & Falkenberg, 2010).

Até ao momento, foram descritas 31 mutações diferentes do *TWINKLE* associadas a deleções ou depleção do mtDNA, resultando em falência energética, e que dão origem a sintomas neuro-musculares (tabela II). Todas as mutações dominantes causam oftalmoplegia externa progressiva autossómica dominante (*adPEO*). Os doentes com *adPEO* podem acumular gradualmente deleções do mtDNA nos tecidos pós-mitóticos, mas geralmente não apresentam depleção do mtDNA. Alguns doentes com *PEO* apresentam sintomas adicionais, tais como cardiomiopatia, ataxia, parkinsonismo e depressão. A maioria das mutações no *TWINKLE*, que

causam *adPEO*, são heterozigóticas e ocorrem em regiões altamente conservadas (Wanrooij & Falkenberg, 2010).

As mutações no *TWINKLE* podem ser de gravidade variável, estando associadas a manifestações clínicas desde *PEO* “puro” de início tardio a fenótipos mais complexos, sendo responsáveis por aproximadamente 30% dos casos de *adPEO* (Spinazzola & Zeviani, 2005).

Tabela II – Mutações descritas do gene *TWINKLE* (Adaptado de Van Hove *et al.*, 2009).

Mutação	Exão	Domínio Funcional	Referências
R303Q	1	Primase motif V	Van Hove <i>et al.</i> [2009]
R303W	1	Primase motif V	Agostino <i>et al.</i> [2003] Virgilio <i>et al.</i> [2008]
W315L	1	Primase motif V	Spelbrink <i>et al.</i> [2001]
W315S	1	Primase motif V	Virgilio <i>et al.</i> [2008]
A318T	1	Primase	Hakonen <i>et al.</i> [2007] ^a
K319T	1	Primase	Deschauer <i>et al.</i> [2003]
K319E	1	Primase	Hudson <i>et al.</i> [2005]
R334Q	1	Primase motif VI	Agostino <i>et al.</i> [2003] Van Goethem <i>et al.</i> [2003]
R334P	1	Primase motif VI	Virgilio <i>et al.</i> [2008]
P335L	1	Primase motif VI	Lewis <i>et al.</i> [2002]
R354P	1	Linker	Spelbrink <i>et al.</i> [2001]
R357P	1	Linker	Rivera <i>et al.</i> [2007]
A359T	1	Linker	Spelbrink <i>et al.</i> [2001] Tyynismäa <i>et al.</i> [2005]
I367T	1	Linker	Spelbrink <i>et al.</i> [2001]
S369P	1	Linker	Spelbrink <i>et al.</i> [2001]
S369Y	1	Linker	Lewis <i>et al.</i> [2002]
F370L	1	Linker	Jeppesen <i>et al.</i> [2008]
R374Q	1	Linker	Spelbrink <i>et al.</i> [2001] Naïmi <i>et al.</i> [2006] Baloh <i>et al.</i> [2007]
L381P	1	Linker	Spelbrink <i>et al.</i> [2001]
S426N	2	Between Walker A and B	Virgilio <i>et al.</i> [2008]
T457I	2	Between Walker A and B	Sarzi <i>et al.</i> [2007] ^a
F458L	2	Between Walker A and B	Kiechl <i>et al.</i> [2004]
W474C	2	Between Walker A and B	Spelbrink <i>et al.</i> [2001]
W474S	2	Between Walker A and B	Virgilio <i>et al.</i> [2008]
A475P	2	Between Walker A and B	Spelbrink <i>et al.</i> [2001] Houshmand <i>et al.</i> [2006]
E479K	2	Between Walker A and B	Virgilio <i>et al.</i> [2008]
F478I	2	Between Walker A and B	Virgilio <i>et al.</i> [2008]
Y508C	3	Between Walker A and B	Nikali <i>et al.</i> [2005] ^a Hakonen <i>et al.</i> [2007] ^a
Dup352_364	1	Linker	Spelbrink <i>et al.</i> [2001] Wanrooij <i>et al.</i> [2004]

Legenda: ^a Mutações identificadas como recessivas em IOSCA.

Nota: A mutação V368I tem sido reconhecida como polimorfismo (Arenas *et al.*, 2003).

2. Objectivos

Os objectivos deste trabalho são a implementação do rastreio genético do gene *TWINKLE* no laboratório de acolhimento, investigação das alterações no gene *TWINKLE* que possam ser, a causa de citopatia mitocondrial em casos com deleções múltiplas do DNA mitocondrial e contribuir para o diagnóstico genético das Citopatias mitocondriais, pela identificação da mutações causais que permitam o aconselhamento genético.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

No presente trabalho usou-se DNA, previamente extraído de sangue periférico no Laboratório de Bioquímica e Genética (LBG) por métodos padronizados, de 23 doentes, 13 do sexo feminino e 10 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 15 e os 83 anos, sendo a média de idade de 50,5 (desvio padrão, dp, $\pm 17,6$). Todos os doentes tinham suspeita de citopatia mitocondrial e foram identificadas deleções múltiplas em rastreio prévio no Laboratório de Bioquímica e Genética por PCR de flanqueamento.

Os doentes são seguidos nos serviços de Neurologia e Neurometabólicas de vários Hospitais do País.

A apresentação Clínica dos doentes encontra-se descrita na tabela III.

O estudo foi conduzido de acordo com as regras éticas e legais a serem seguidas em estudos genéticos.

Tabela III – Apresentação Clínica dos doentes em estudo.

Doente	Clínica
1	Miopatia; Ataxia
2	Doença neurodegenerativa progressiva; Ataxia; Leucodistrofia
3	Displasia óssea metafisária; Baixa estatura; Calcificações intracranianas; Dificuldades escolares
4	Doente com atraso cognitivo; Hipotonia generalizada
5	Miopatia
6	Miopatia; Alterações anatomo-patológicas sugestivas de doença mitocondrial
7	Miopatia (CK elevada)
8	Oftalmoplegia externa progressiva
9	Ataxia; Surdez; Neuropatia periférica
10	Miopatia; Surdez neurosensorial; Disfunção endócrina
11	Miopatia Mitocondrial; Surdez
12	Miopatia
13	Miopatia com ptose palpebral
14	Oftalmoplegia externa progressiva
15	Miopatia
16	Diplopia flutuante
17	Doença mitocondrial
18	Oftalmoplegia externa progressiva
19	Miopatia; Diabetes
20	Miopatia
21	Miopatia; Ptose palpebral; Cardiomiopatia
22	Atraso de desenvolvimento psicomotor
23	Disautonomia; Mialgias generalizadas

Nota: a idade e o sexo foram omitidos para garantir maior confidencialidade.

3.2. Amplificação dos exões do gene *TWINKLE*

A sequência do gene foi obtida nas bases de dados (p.e NCBI) e os *primers* (Invitrogen, Eugene, Estados Unidos da América) foram desenhados recorrendo ao *software Primer3*®.

3.2.1. Amplificação genética por *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

A técnica de PCR foi descoberta na década de 1980 pelo Dr. Kary Banks Mullis na Califórnia. Kary Banks Mullis recebeu o prémio Nobel de química em 1993 para a invenção da PCR (Mullis *et al.*, 1986).

A técnica de PCR tem como base o processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo*, e tem a capacidade de amplificar sequências de DNA específicas, através de uma síntese *in vitro*. A partir de algumas moléculas de DNA que servem de molde, é possível produzir milhões de cópias de um segmento genómico característico. O método da PCR é hoje em dia comum na genética e biologia molecular, tendo trazido um enorme progresso a áreas como o diagnóstico de doenças, medicina forense entre muitas outras, para além da Investigação em Biomédica. Este método é muito sensível e por esse motivo, deve ser realizado com o máximo de cuidado a fim de evitar contaminações e resultados falsos (Ma *et al.*, 2006).

Durante a PCR são usadas temperaturas elevadas, de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química (Saiki, 1990). Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a actuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes

do DNA a amplificar. Para realizar a PCR, são necessárias pequenas quantidades do DNA alvo a amplificar, um tampão salino contendo a *DNA polimerase*, os *primers*, os quatro desoxinucleotídeos trifosfatos constituintes do DNA (dNTPs, N = A, C, G, T) e outros reagentes tais como Mg^{2+} ou DMSO, que tem como função otimizar as condições da reacção, uma vez que influenciam a sua especificidade. O Mg^{2+} aumenta substancialmente a estabilidade da enzima e da cadeia de DNA, enquanto que o DMSO aumenta a capacidade de ligação dos *primers* e a cadeia molde, porque diminui a interacção *primer-primer* e *primer-molde* (Bej *et al.*, 1990).

Esta mistura é submetida a vários ciclos (25 – 40) de amplificação, que consistem em três fases principais (Figura 8) (Charlieu, 1994):

1ª Fase – *Desnaturação*: abertura das cadeias do DNA alvo pelo calor (tipicamente 1-5 minutos a 94 -96°C), de modo a separar as duas cadeias.

2ª Fase - *Annealing*: ligação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao DNA alvo em cadeia simples. Para permitir essa interacção, a mistura de reacção é arrefecida (tipicamente, a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da % GC da sequência a amplificar).

3ª Fase - *Extensão*: extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar à cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase (tipicamente 1 minuto a 72°C) (Charlieu, 1994).

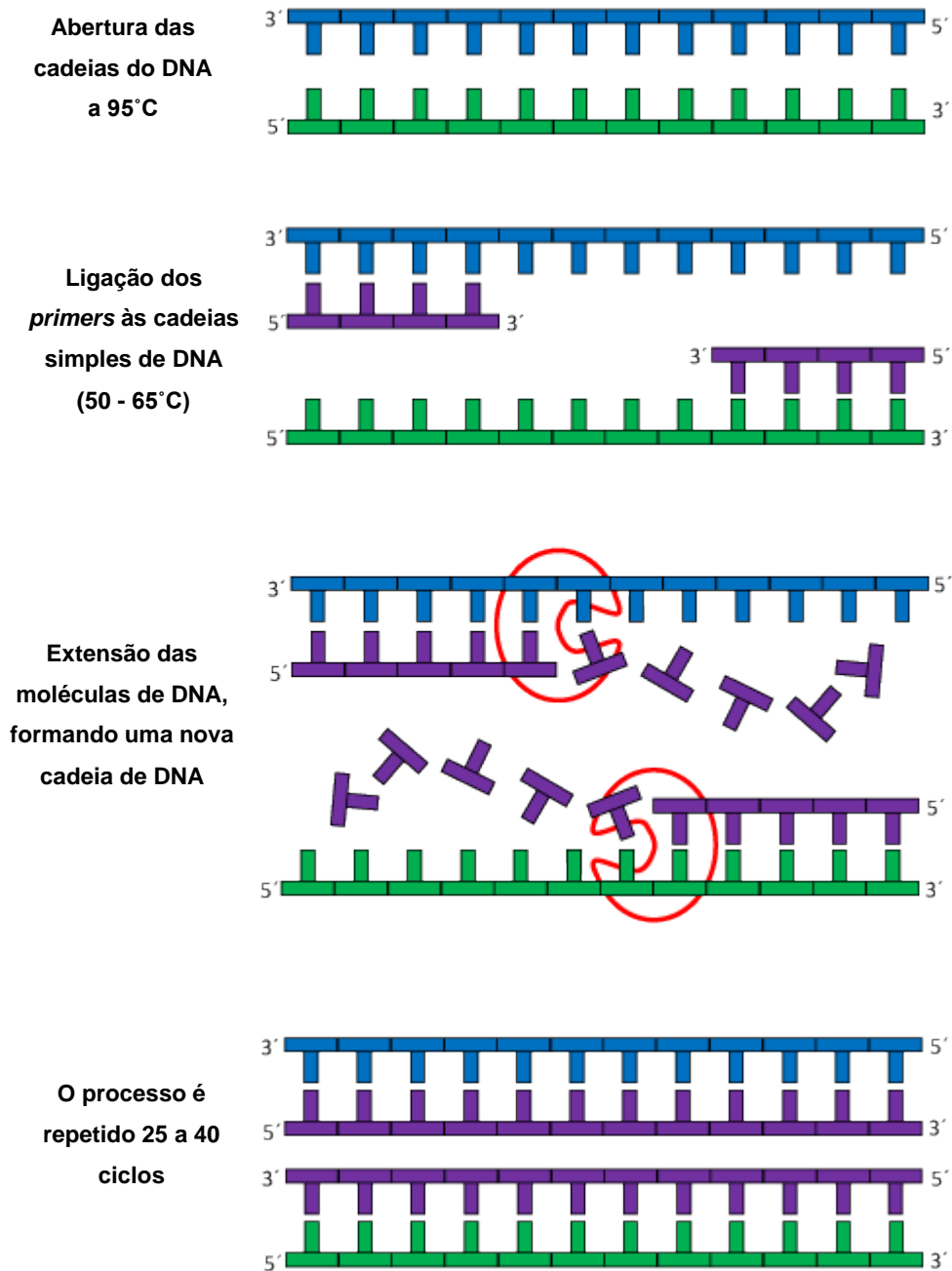


Figura 8 – Representação esquemática das fases da PCR (Adaptado de <http://www2.le.ac.uk/departments/emfpu/genetics/explained/images/PCR-process.gif>).

Todos os componentes da reacção (tabela IV) são misturados e distribuídos uniformemente para serem adicionados à amostra de DNA, garantindo que as

quantidades dos componentes estão distribuídos igualmente em todas as amostras, de modo a que o DNA a analisar seja a única variável a ser investigada (Saiki, 1990).

De um modo geral, os métodos otimizados num laboratório deverão ser capazes de ser reproduzidos noutra laboratório, pois a eficiência de amplificação é sensível a diversos factores.

No presente trabalho, foi otimizada a amplificação de todos os fragmentos, seguindo as indicações acima referidas, usando os reagentes mencionados.

Tabela IV - Componentes da mistura da PCR

Reagentes	Volume (μ l)
Tampão	1
dNTP's	1
<i>Primer Forward</i>	0,2
<i>Primer Reverse</i>	0,2
H ₂ O	6,5
Taq	0,1
DNA	1
Total: 10μl/ amostra	

Legenda: dNTP's = Desoxinucleótidos (N = A, C, G, T)

3.3. Electroforese em gel de agarose

A visualização dos produtos amplificados é habitualmente feita após electroforese e posterior coloração do gel com brometo de etídio, um corante fluorescente por exposição a uma fonte de luz ultravioleta, que se intercala entre as bases do DNA (Regateiro, 2003).

O estudo da electroforese de DNA teve início em 1964 e é um processo que permite separar e identificar rápida e eficazmente, moléculas de DNA. A separação é feita com base na aplicação de um campo eléctrico numa tina. Os iões e moléculas carregados negativamente deslocam-se para o ânodo, enquanto os iões e moléculas

carregados positivamente se deslocam para o cátodo. Quanto maior a voltagem aplicada mais rapidamente as moléculas se movem (Stellwagen, 2009).

Como o DNA linear de dupla cadeia atravessa a matriz a uma taxa inversamente proporcional ao logaritmo do seu peso molecular, ao comparar o fragmento de interesse com os fragmentos de um marcador de peso molecular conhecido, pode estimar-se o peso molecular do fragmento em estudo.

A agarose é uma das substâncias mais utilizadas para fazer o gel e é constituída por um polissacarídeo de cadeia longa que e obtido a partir de uma alga (Stellwagen, 2009).

No presente trabalho usou-se gel de agarose, contendo brometo de etídeo. A função do brometo de etídeo é intercalar-se entre as bases de DNA e quando o complexo brometo de etídeo-DNA é irradiado por luz UV, emite fluorescência laranja, que permite visualizar os fragmentos de DNA. É importante realçar que o brometo de etídeo é mutagénico, sendo necessária especial atenção na utilização deste reagente.

As electroforeses realizadas neste trabalho tiveram o objectivo de confirmar a amplificação dos produtos, em gel de agarose de 1%, usando dois marcadores de peso molecular diferentes, dependendo do tamanho do fragmento em questão (1583, 1305, 1305, 607 e 943 pb, respectivamente para os exões 1 a 5 do gene *TWINKLE*), o *Mass Ruller DNA Ladder Mix* (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e o *PUC 8 MIX* (Fermentas, Vilnius, Lituânia). O registo das imagines foi efectuado sob irradiação UV no transiluminador do equipamento *ChemiDoc™ XRS* (Bio-rad, Berkeley, Estados Unidos da América), usando o respectivo *software*.

3.4. Purificação dos produtos de PCR

Esta técnica tem como objectivo remover vestígios de *primers* e dNTP's (N = A, C, G, T) que continuam na mistura do produto de PCR, após a amplificação, e que

podem interferir com o processo de sequenciação. Podem usar-se vários métodos, mas no presente trabalho foi usada a *ExoSAP®*, que contém duas enzimas hidrolíticas, a *exonuclease I* e a *fosfatase alcalina*. A primeira degrada *primers* e restos de DNA de cadeia simples (ssDNA) inespecíficos, produzidos durante a PCR, enquanto a *fosfatase alcalina* hidroliza dNTP's (N = A, C, G, T) que ficaram livres e que podem prejudicar a reacção de sequenciação (Werle *et al.*, 1994).

Para este trabalho foi adicionada a *ExoSAP®* (2µl) às amostras previamente amplificadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.5. PCR de Sequenciação

Após a purificação com *ExoSAP®* efectua-se uma reacção de PCR de sequenciação (produto de PCR purificado, tampão, *primer* 3,2mM, ddNTPs e água), usando um programa de PCR preestabelecido pelo fabricante.

3.6. Purificação dos produtos para electroforese de Sequenciação

As técnicas para purificação de produtos de PCR podem ser variados, tais como ultrafiltração, precipitação com etanol, gel de purificação e purificação enzimática.

No presente trabalho, procedeu-se à purificação dos produtos com etanol. Os produtos foram dissolvidos com Formamida (reagente usado para estabilizar as cadeias de DNA).

3.7. Sequenciação automática

A sequenciação do DNA permite determinar a ordem pela qual as bases constituem um fragmento de DNA. Os fragmentos de DNA sujeitos a sequenciação

podem ser obtidos por PCR ou por clonagem (Regateiro, 2003). O conhecimento das sequências de genes ou de partes do genoma tornou-se indispensável para a investigação dos processos biológicos, processos forenses, e para as áreas de diagnóstico (Pettersson *et al.*, 2009).

A sequenciação de DNA tem sido o foco principal do desenvolvimento tecnológico desde o prémio Nobel de Gilbert e Sanger (Karger & Guttman, 2009).

Inicialmente, foram descritos dois métodos diferentes para sequenciar o DNA: um por Maxam e Gilbert e outro por Sanger. Os dois métodos exigem uma electroforese com capacidade para diferenciar fragmentos de DNA em que o tamanho diverge apenas por uma base (Regateiro, 2003; Karger & Guttman, 2009).

O método de Maxam e Gilbert é baseado na degradação das bases do DNA de um modo específico por reagentes químicos (Regateiro, 2003).

O método de Sanger é de natureza enzimática e parte também de DNA monocatenar. A partir de um “*primer*” iniciador da replicação, esta é promovida por extensão do “*primer*” mediada por uma polimerase do DNA. Os desoxinucleótidos (dNTPs) de adenina, guanina, citosina e timina são sequencialmente adicionados pela ordem determinada pela cadeia de DNA modelo. Sucessivamente, vão-se estabelecendo as ligações fosfodiester ao longo da cadeia, entre os dNTPs adicionados. Em cada uma das quatro soluções de reacção, além dos quatro dNTPs, um dos quais marcado, existe um di-desoxinucleótido (ddNTPs) diferente, que compete com o dNTP correspondente e é aleatoriamente adicionado pela enzima ao polímero de DNA em extensão, em vez de um dNTP. Quando um ddNTP é adicionado, é inibida a possibilidade de estabelecer a ligação fosfodiester com um dNTP subsequente. Assim, a extensão do “*primer*” termina, originado-se, desse modo, fragmentos de DNA de comprimento diverso. Após a electroforese, é possível deduzir, a partir do tamanho dos fragmentos, a sequência das bases que compõem o fragmento de DNA analisado (Regateiro, 2003).

O método automático de sequenciação do DNA também se baseia na terminação da replicação por um ddNTP. No entanto, cada ddNTP é marcado com um fluorocromo diferente e a electroforese é feita em tubo capilar. Num determinado ponto do capilar, incide um faixe de laser que excita os fluorocromos e provoca a emissão de fluorescência com um determinado comprimento de onda, em função do fluorocromo encontrado. Cada nucleótido é assim identificado pela cor que emite, por exemplo, o verde para a adenina, o amarelo para a guanina, o azul para a citosina e o vermelho para a timina (figura 9). Os dados são tratados por um “software” adequado, de modo a indicarem a ordem pela qual se encontram no fragmento de DNA original (Regateiro, 2003).

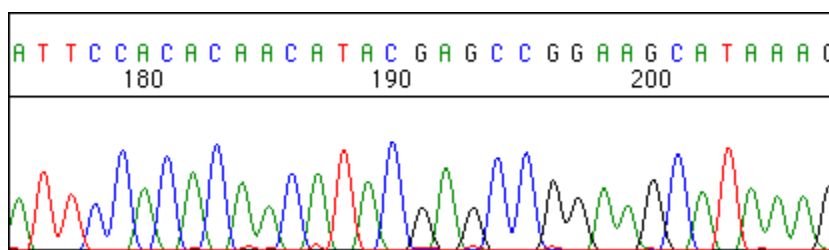


Figura 9 – Exemplo de uma sequência, resultado da sequenciação automática (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems Chemistry Guide).

3.8. Análise das sequências

Para analisar as sequências obtidas usou-se o programa *SeqScape v2.5* (Applied Biosystems, Foster, Estados Unidos da América) por comparação com a sequência de referência, obtida de uma base de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Deste modo, é possível detectar de um modo rápido e eficaz qualquer alteração de sequência da amostra. A nomenclatura utilizada para as variações de sequência encontradas, foram seguidas por Dunnen & Antonarakis (2000).

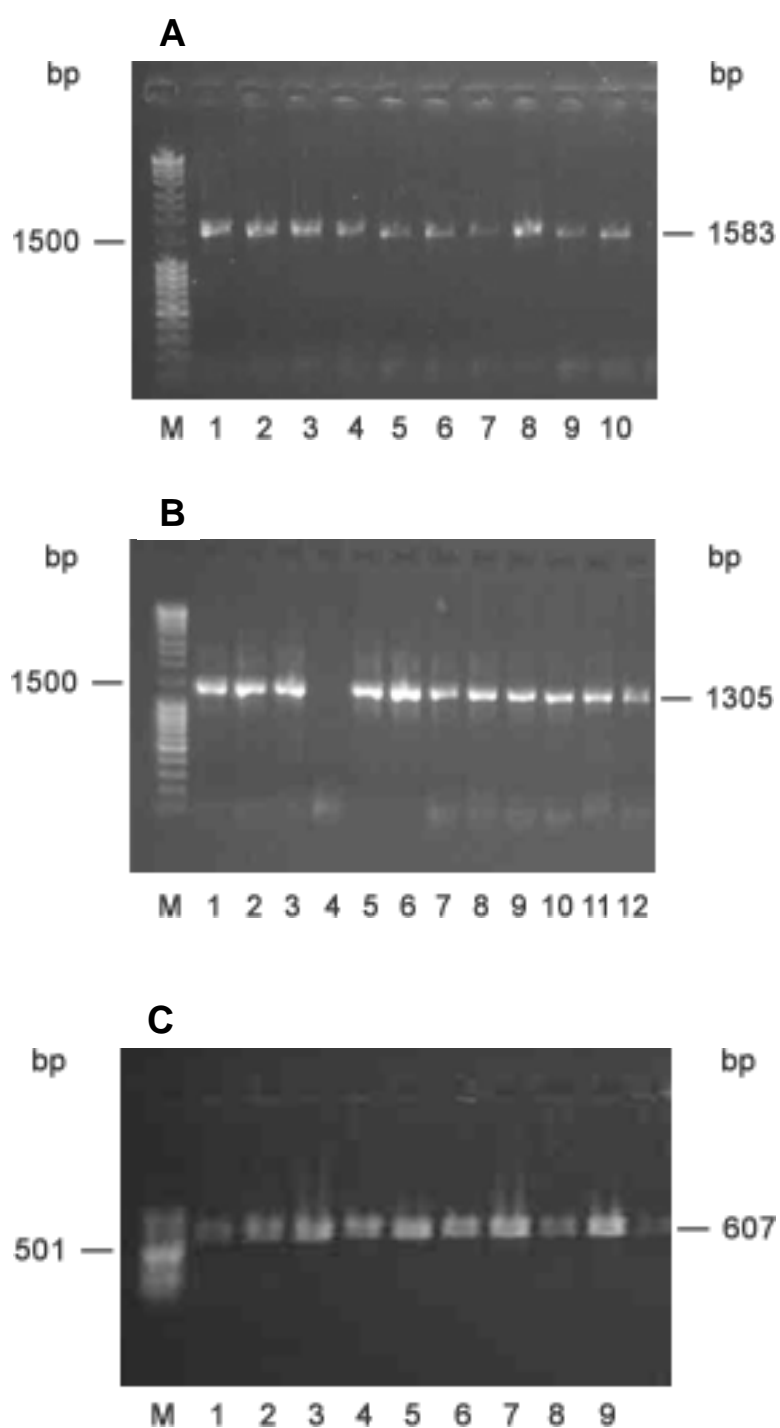
3.9. Análise *in Silico*

O estudo de *splicing* foi efectuado para as alterações encontradas na região não codificante, que se situassem imediatamente antes ou depois do início/fim do exão, com recurso ao *SplicePort* (Dogan *et al.*, 2007).

4. Resultados

4.1. Análise da sequência genética do gene *TWINKLE*

Na figura 10 estão apresentados os resultados da amplificação de algumas amostras, para os exões do gene *TWINKLE*.



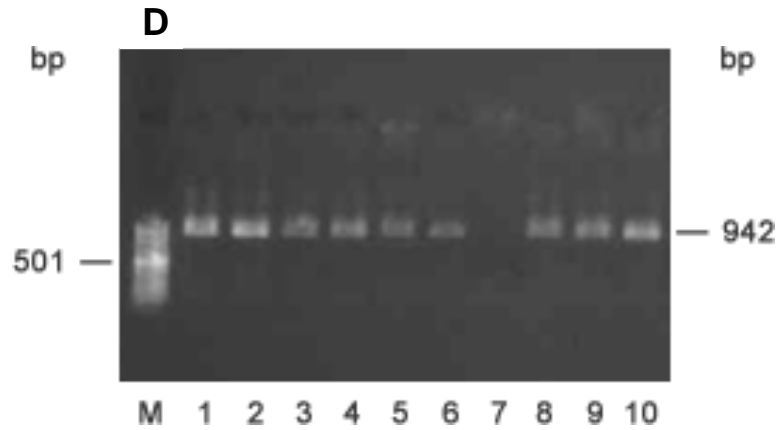


Figura 10 – Amplificações de amostras em cada um dos exões.

A - Amplificações de 10 amostras do exão 1; **B** - Amplificações de 12 amostras dos exões 2 e 3; **C** - Amplificações de 9 amostras do exão 4; **D** - Amplificações de 10 amostras do exão 5.

Após a verificação da amplificação por PCR, todas as amostras foram sequenciadas de acordo com a metodologia descrita anteriormente para todos os exões e regiões adjacentes do gene *TWINKLE*. Não foram encontradas quaisquer alterações nos exões 1 e 2. Na análise dos exões 3, 4 e 5 foram identificadas alterações nos intrões 2,3 e 4, (tabela V) que se apresentam de seguida.

Tabela V – Alterações encontradas correspondentes a cada doente. [Continuação]

Doente	Alterações encontradas	Heterozigotia
1	IVS3-5C>T IVS3-3T>C IVS4+16C>A IVS4+84G>A IVS4-202G>A	Sim
2	IVS3-5C>T IVS3-3T>C IVS4+16C>A IVS4+84G>A IVS4-202G>A	Sim
3	IVS3-5C>T IVS3-3T>C IVS4+16C>A IVS4+84G>A IVS4-202G>A	Sim
5	IVS2-253DelATGGCA	Sim
6	IVS2-253DelATGGCA	Não
7	IVS2-253DelATGGCA	Sim
8	IVS2-253DelATGGCA	Não
9	IVS4-202G>A	Sim
11	IVS2-253DelATGGCA	Não
12	IVS3-5C>T IVS3-3T>C IVS4+16C>A IVS4+84G>A c.IVS2-253DelATGGCA	Não
13	IVS2-253DelATGGCA	Não
14	IVS3-5C>T IVS3-3T>C IVS4+16C>A IVS4+84G>A	Sim

Tabela V – Alterações encontradas correspondentes a cada doente. [Continuação]

Doente	Alterações encontradas	Heterozigotia
15	IVS2-253DelATGGCA	Não
19	IVS2-253DelATGGCA	Sim
20	IVS2-253DelATGGCA	Não
21	IVS3-5C>T IVS3-3T>C IVS4+16C>A IVS4+84G>A c.IVS2-253DelATGGCA	Sim
22	IVS2-253DelATGGCA	Sim
23	IVS3-5C>T IVS3-3T>C IVS4+16C>A IVS4+84G>A c.IVS2-253DelATGGCA	Sim

A análise das sequências do exão 3 permitiu identificar uma deleção no intrão 2, IVS2-253DelATGGCA, em 13 doentes (7 homozigotos). A figura 11 - A mostra que a deleção se encontra em homozigotia. Por outro lado, no doente 5 (Figura 11 - B), a deleção encontra-se somente num alelo. Observa-se que, exactamente antes da deleção (lado esquerdo da seta preta) existem duas sequências sobrepostas, o que significa que só um alelo sofreu a deleção. A figura 11 – C representa a sequência do doente 1, em que não foi encontrada a alteração, tendo presente nos dois alelos o conjunto de 6 nucleótidos, ATGGCA.

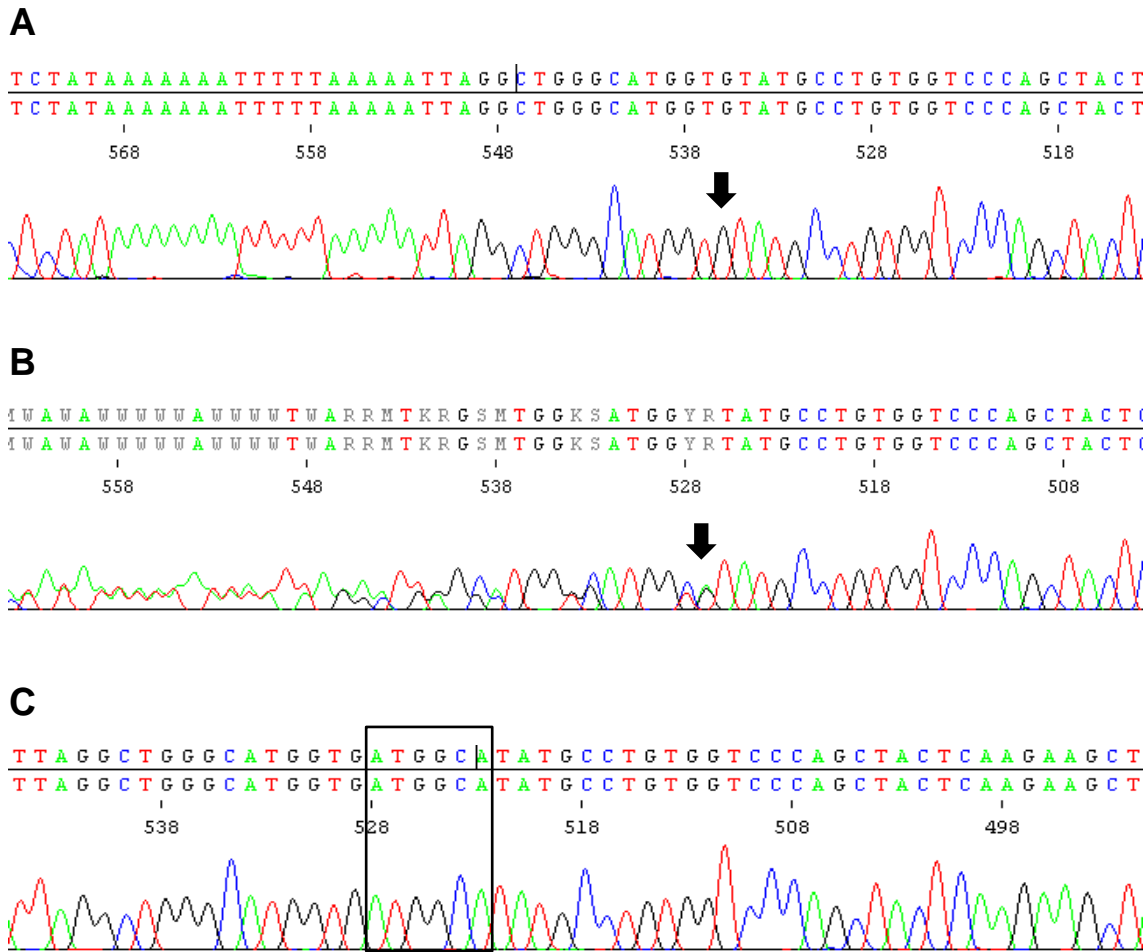


Figura 11 - Electroferograma da alteração IVS2-253DelATGGCA encontrado na análise do exão 3.

A – Homozigotia (doente 6); **B** – Heterozigotia (doente 5); **C** – Sem alteração (doente 1).

Na figura 12 estão assinaladas duas alterações identificadas através da análise da região adjacente do exão 4, IVS3-5C>T e IVS3-3T>C, ambas no intrão 3, nos doentes (1, 2, 3, 21 e 23) em heterozigotia, pois apresentam dois picos sobrepostos para a mesma posição.

Foram ainda encontradas mais duas alterações no intrão 4, IVS4+16C>A e IVS4+84G>A.

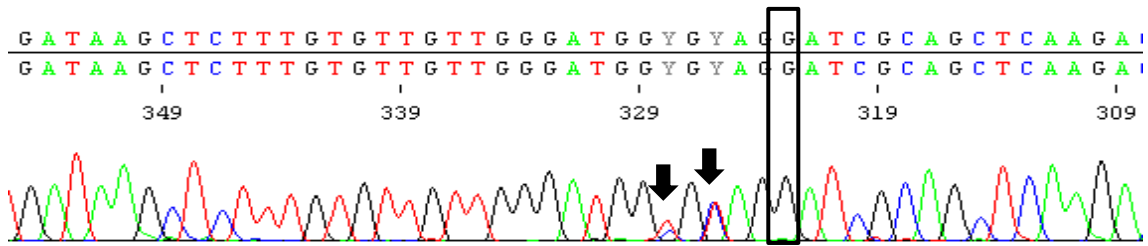


Figura 12 – Electroferograma relativo às alterações IVS3-5C>T e IVS3-3T>C, em heterozigotia, no intrão 3. O rectângulo preto indica o início do exão 4.

A figura 13 representa a variação de sequência IVS4-202G>A, encontrada na região adjacente do exão 5, no intrão 4 em heterozigotia, identificada nos doentes 1, 2, 3, 9, 21 e 23.

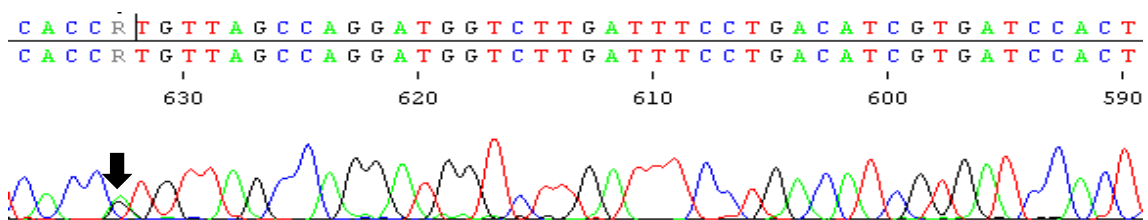


Figura 13 – Electroferograma relativo à alteração IVS4-202G>A, em heterozigotia, no intrão 4.

4.2. Frequências genóticas e alélicas

Habitualmente, os estudos da frequência de um alelo numa população são feitos em amostras representativas dessa população. A soma das frequências de todos os alelos correspondentes a um *locus* é igual a “1” ($p_A + q_A = 1$), no caso de dois alelos) (Regateiro, 2003).

Após a análise detalhada de todas as variantes encontradas, foram calculadas as frequências genóticas e alélicas (Tabela VII) na população de doentes em estudo.

Tabela VI – Descrição das alterações encontradas na análise dos exões 3, 4 e 5.

Intrão	Alteração encontrada	r#s	Alteração de aminoácido	Frequência Genótipica Calculada/Publicada	Frequência alélica Calculada/Publicada
2	IVS2-253DelATGGCA	33963364	Não	Del./Del. - 0,389/0 Del/ATGGCA - 0,333/1 ATGGCA/ATGGCA - 0,278/0	Del. - 0,56/0,50 ATGGCA - 0,45/0,50
3	IVS3-5C>T	3740485	Não	CC- 0,70/0,72 CT - 0,26/0,23 TT - 0,04/0,05	C- 0,83/0,84 T- 0,17/0,16
3	IVS3-3T>C	3740486	Não	TT- 0,70/0,72 TC - 0,26/0,23 CC - 0,04/0,05	T- 0,83/0,84 C- 0,17/0,16
4	IVS4+16C>A	3740487	Não	CC- 0,70/0,72 CA - 0,26/0,23 AA - 0,04/0,05	C- 0,83/0,84 A- 0,17/0,16
4	IVS4+84G>A	3824783	Não	GG-0,70/0,72 GA - 0,26/0,23 AA - 0,04/0,05	G- 0,83/0,84 A- 0,17/0,16
4	IVS4-202G>A	4919511	Não	GG- 0,64/0,67 GA - 0,36/0,28 AA - 0/0,06	G- 0,82/0,81 A- 0,18/0,19

Legenda: Del. – Deleção

A figura 14 mostra que existe maior número de doentes com alterações (78%) no presente estudo.

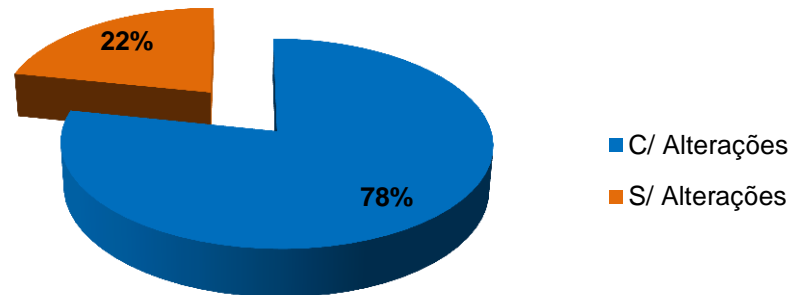


Figura 14 - Distribuição (%) dos doentes com e sem alterações encontradas no gene *TWINKLE*.

As alterações identificadas no presente estudo encontram-se maioritariamente em heterozigotia (73%) (Figura 15).

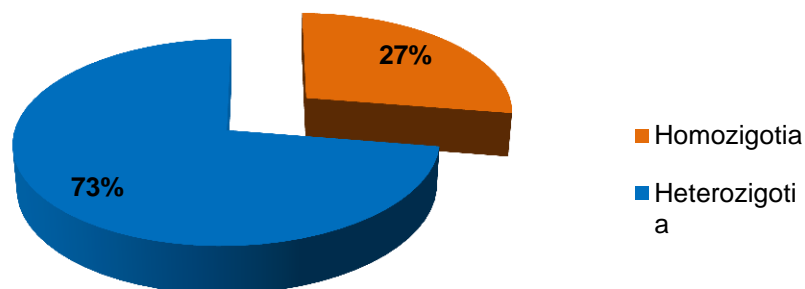


Figura 15 - Homozigotia vs. Heterozigotia (%) das alterações genéticas encontradas no gene *TWINKLE*.

Das alterações identificadas, as variações IVS3-5C>T, IVS3-3T>C e IVS4+16C>A podem afectar a zona de *splicing*. Nesse sentido, foi efectuada a análise “*in silico*” para detectar possíveis alterações de *splicing*, o que não se verificou.

Na tabela V estão representadas a localização das alterações encontradas em cada uma das diferentes isoformas do gene *TWINKLE*.

Tabela VII – Alterações encontradas para cada uma das diferentes isoformas.

r#s	NM_021830 (Isoforma A)	NM_001163812 (Isoforma B)	NM_001163813 (Isoforma C)	NM_001163814 (Isoforma D)
33963364	Intrão (IVS2-253DelATGGCA)	Intrão (IVS2-253DelATGGCA)	Intrão (IVS2-253DelATGGCA)	Intrão (IVS2-253DelATGGCA)
3740485	Intrão (IVS3-5C>T)	Intrão (IVS3-5C>T)	Intrão (IVS3-5C>T)	Intrão (IVS3-5C>T)
3740486	Intrão (IVS3-3T>C)	Intrão (IVS3-3T>C)	Intrão (IVS3-3T>C)	Intrão (IVS3-3T>C)
3740487	Intrão (IVS4+16C>A)	Não Codificante (IVS4+1C>A)	Intrão (IVS4+16C>A)	Não Codificante (IVS4+1C>A)
3824783	Intrão (IVS4+84G>A)	Intrão (IVS4+84G>A)	Intrão (IVS4+84G>A)	Intrão (IVS4+84G>A)
4919511	Intrão (IVS4-202G>A)	Intrão (IVS4-202G>A)	Intrão (IVS4-202G>A)	Intrão (IVS4-202G>A)

5. Discussão

Através da análise das sequências obtidas do exão 3 e regiões adjacentes identificamos uma deleção (IVS2-253DelATGGCA) no intrão 2 em 13 doentes. Esta alteração já se encontra descrita em várias bases de dados (p.ex. NCBI) como um *SNP*, cuja identificação é r#s33963364.

Observando as frequências genóticas e alélicas (Tabela VI), verifica-se que o alelo mais comum na população em estudo é a deleção. Os dados da população europeia referenciados no NCBI mostram que, para a mesma alteração, a referência é cerca de 50%. Estes dados são concordantes com os resultados obtidos no presente trabalho, sugerindo que esta alteração, por si só não deverá ser responsável pelo fenótipo clínico.

As alterações IVS3-5C>T, IVS3-3T>C e IVS4+16C>A, identificadas na nossa análise são, possivelmente polimorfismos, segundo Van Hove e colaboradores (Van Hove *et al.*, 2009). Além de se encontrarem na zona intrónica, estas situam-se muito próximas do exão, ou seja na zona de *splicing*. Por este motivo, foi realizado um teste *in silico* recorrendo ao *Software SplicePort®*, uma ferramenta que permite realizar uma análise previsão do *splicing* (Dogan *et al.*, 2007). Os resultados mostram que é pouco provável que as alterações identificadas alterem o *splicing*, comparativamente à sequência normal.

As alterações identificadas, no presente trabalho, ao nível do exão 4 e regiões adjacentes, têm exactamente a mesma frequência para todos os genótipos encontrados, ou seja cada conjunto de alterações foi detectado no mesmo doente. Se um doente é heterozigótico para uma determinada variante, então também o é para os restantes. O mesmo aconteceu para os doentes com homozigotia. Assim, todas as variantes identificadas nos intrões 3 e 4 (IVS3-5C>T, IVS3-3T>C, IVS4+16C>A e IVS4+84G>A) têm a mesma frequência genotípica, sugerindo que estas alterações são herdadas em *linkage*, isto é, os alelos são herdados em conjunto. No estudo de Van Hove e colaboradores, todos os polimorfismos foram identificados na mesma

doente, em heterozigotia, o que apoia a hipótese de *linkage* das alterações referidas (Van Hove *et al.*, 2009).

O doente 12 foi o único em que se encontrou um genótipo homozigótico. Este doente apresentamiopatia. Contudo outros doentes do nosso estudo também apresentam um quadro clínico semelhante e não têm o mesmo genótipo, não sendo possível correlacionar os dados.

A alteração IVS4-202G>A encontra-se a grande distância do início do exão 5 e está descrita (NCBI) como um *SNP*, *r#s4919511*. As frequências das variações de sequência identificadas são semelhantes às da população europeia que consta na base de dados NCBI.

Tendo em conta que existem quatro isoformas para o gene *TWINKLE*, fomos analisar as alterações encontradas relativamente à sua localização em cada uma das isoformas (tabela VII). Até ao exão 4, todas as isoformas são semelhantes (figura 6). Em duas isoformas, o exão 4 é mais extenso, seguindo-se uma região não codificante. Verificou-se em pormenor as sequências de cada uma e nomeadamente se a alteração IVS4+16C>A ainda estava incluída no exão 4 e se poderia alterar o aminoácido. No entanto, o exão termina no nucleótido antes da posição da alteração, o que corresponde a um codão de STOP (TAG). Isto significa que a região codificante termina antes da alteração. Mesmo com este facto, foi possível verificar se o codão em que se encontrava a alteração modificava o aminoácido, concluindo-se que era uma alteração silenciosa.

Vários estudos recentes demonstram que já foram descritas 31 mutações diferentes do gene *TWINKLE* associadas a deleções ou depleção do mtDNA (Wanrooij & Falkenberg, 2010).

No estudo realizado por Houshmand *et al.* (2006) foram analisados 23 doentes (biopsia de músculo) Iraquianos com oftalmoplegia externa progressiva. Os resultados demonstraram que 16 dos doentes apresentavam deleções no mtDNA (4 doentes tinham deleções múltiplas), 2 doentes apresentavam uma mutação no gene *TWINKLE*

(G1423C) sem nenhuma deleção no mtDNA e os restantes 5 doentes não mostraram quaisquer deleções no mtDNA ou mutações no gene *TWINKLE*. Neste estudo, verificaram que podem ocorrer mutações no gene *TWINKLE* em doentes com fenótipos semelhantes a doenças mitocondriais, mas sem deleções múltiplas (Houshmand *et al.*, 2006). Foram, também identificadas duas mutações no gene *TWINKLE* em 3 das 11 famílias Australianas estudadas por Lewis e colaboradores, com oftalmoplegia externa progressiva (*adPEO*) (Lewis *et al.*, 2002). Segundo esse estudo, as deleções múltiplas do mtDNA nas biopsias musculares são amplamente consideradas a ser uma marca de registo para o diagnóstico molecular de *adPEO*. Todos os doentes apresentavam um padrão de deleções comum, embora com diferenças fenotípicas entre si. De momento não há correlação conclusiva entre genótipo e fenótipo. Apesar de oftalmoplegia e ptose serem características comuns de todas as famílias descritas na literatura, existem sintomas adicionais que variam muito e nenhum parece ser comum entre famílias com mutações nos genes *TWINKLE* ou *ANT1* (Lewis *et al.*, 2002). No presente estudo todos os doentes continham deleções múltiplas, no entanto não foram identificadas quaisquer mutações.

Jeppesen e Colaboradores descreveram uma mutação *de novo* no gene *TWINKLE* (1110C>A). Esta mutação foi identificada numa mãe e seus dois filhos, a mãe tinha oftalmoplegia externa progressiva, fraqueza muscular, neuropatia muscular, neuropatia sensorial, intolerância à glicose, entre outros sintomas. De acordo com exames morfológicos no músculo, foram identificadas deleções múltiplas e depleção nos seus filhos. Nesse estudo, foram avaliados 50 controlos saudáveis (100alelos), onde a mutação não estava presente (Jeppesen *et al.*, 2008).

A identificação da mutação missense K319T, por Deschauer *et al.* (2003), confirma o papel casual de mutações no gene *TWINKLE* (Deschauer *et al.*, 2003). Noutros estudos, doentes com *adPEO* e de diferentes etnias, foram analisados e apresentavam apenas *PEO* e fraqueza dos membros, sem sinais de envolvimento sistémico (Lewis *et al.*, 2002). Estes dados podem sugerir que famílias com defeitos

genéticos no gene *TWINKLE* exibem uma apresentação de *adPEO* sem envolvimento sistémico, isso pode ser importante para decidir qual o gene a investigar noutros casos que apresentam *adPEO* (Deschauer *et al.*, 2003).

Foi descrita por Kiechl *et al.* (2004) uma mutação (F485L) no gene *TWINKLE* no exão 2. As duas famílias estudadas apresentavam transmissão dominante de oftalmoplegia externa progressiva. No entanto, somente numa família foi identificada a nova mutação, na outra família não foram encontradas mutações em nenhum dos genes conhecidos relacionados com *PEO*. A presença de deleções múltiplas foi identificada em dois doentes. As manifestações clínicas das famílias eram típicas de doença mitocondrial (cardiomiopatia dilatada, miopatia generalizada, diabetes *metillus* e perda auditiva) (Kiechl *et al.*, 2004). As clínicas de doentes em estudos descritos anteriormente, que apresentam mutações no gene *TWINKLE*, são muito variadas. Os doentes em estudo apresentam uma clínica de suspeita de citopatias mitocondrias, ou seja muitos variáveis. No entanto, através dos estudos descritos e dos resultados do presente estudo, não é totalmente garantido que doentes com clínicas semelhantes ou até mesmo muito diferentes apresentem mutações no gene *TWINKLE*. As mutações no gene em casos de deleções múltiplas também nem sempre são confirmadas.

Recentes avanços em genética molecular de *PEO*, permitiram uma classificação mais específica. Formas esporádicas ou herdadas de *PEO* são frequentemente causadas por deleções múltiplas do mtDNA e várias mutações em genes mitocondriais, tRNA. As frequências estimadas de mutações em *adPEO* variam conforme o gene, 4-10% para o gene *ANT1*, 15-53% para o gene *TWINKLE* e 45% para o gene *POLG* (Kiechl *et al.*, 2004). O gene *TWINKLE* tem uma frequência mutagénica muito variável, o que pode justificar os resultados do presente estudo.

Através do estudo realizado por Hakonen *et al.* (2007), por análise de PCR, não foram detectadas deleções múltiplas no mtDNA em alguns doentes, mas a depleção foi identificada no fígado e possivelmente no cérebro, indicando que a função do *TWINKLE* é comprometida nos tecidos. As deleções múltiplas do mtDNA são

encontradas tipicamente no músculo de adultos com mutações no gene *TWINKLE* (Spelbrink *et al.*, 2001; Deschauer *et al.*, 2003; Hudson *et al.*, 2005 & Hakonen *et al.* 2007).

Na medida de determinar o espectro mutacional dos genes *ANT1*, *TWINKLE* e *POLG*, envolvidos na estabilidade do mtDNA, Naïmi e colaboradores estudaram uma série de doentes com doenças mitocondriais. Observaram que o gene *POLG* apresentava um maior número de mutações (Naimi *et al.*, 2006).

Comparativamente com os estudos já realizados com o gene, todos os resultados do estudo conduzem a um conhecimento da variabilidade das mutações do gene *TWINKLE*.

Ao realizar-se estudos com o gene *TWINKLE* é difícil de prever os resultados que se poderá encontrar, pois na literatura existe uma divergência de resultados encontrados para a análise deste gene.

6. Conclusões

O objectivo deste trabalho era o de analisar a existência de mutações no gene *TWINKLE* em doentes com deleções múltiplas do mtDNA. Apesar de já estar descrito que o gene *TWINKLE* é um dos responsáveis pelas deleções múltiplas do mtDNA, nomeadamente em doentes com oftalmoplegia externa progressiva, no presente trabalho não se detectou qualquer mutação patogénica.

É importante salientar que muitos estudos na literatura acerca de mutações encontradas no gene *TWINKLE* são realizados com uma população controlo para termo de comparação com os doentes (Deschauer *et al.*, 2003; Jeppesen *et al.*, 2008 & Van Hove *et al.*, 2009). Seria interessante completar o nosso estudo com a análise do DNA de uma população controlo.

Apesar de não termos identificado alterações patogénicas no gene *TWINKLE*, não podemos excluir o seu envolvimento, uma vez que existe a hipótese de poderem ocorrer erros ao nível da transcrição e tradução, que não dependem da sequência de DNA. Uma vez que Lewis e Hakonen (Lewis *et al.*, 2002; Hakonen *et al.*, 2007) demonstraram que existe um elevado nível de expressão deste gene no músculo, essa é uma hipótese a ter em conta. Por outro lado, outros genes, como o *ANT1* e *POLG*, podem estar envolvidos, uma vez que já foram descritas mutações nestes genes associados a deleções múltiplas do mtDNA.

No entanto, este estudo representa um contributo importante para a implementação do diagnóstico genético das deleções múltiplas no Laboratório de acolhimento.

7. Referências Bibliográficas

- Bej A K, Mahbubani M H & Atlas R M (1991). Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 26:301-334.
- Buroke N E, Brown J R, Gilbert T A P, O'Hara J, Beckenbach A T, Thomase W K & Smith M J (1990). Length Heteroplasmy of Sturgeon Mitochondrial DNA: An Illegitimate Elongation Model. *Genetics*. 124: 157-163.
- Charlieu J P (1994). PCR as a technique used daily in molecular biology. PCR technology – current innovations. Florida: library of congress cataloging-in-publication data. ISSN 0-8493-8674-8. p. 1-4.
- Deschauer M, Kiefer R, Blakely E L, He L, Zierz S, Turnbull D M & Taylor R W (2003). A novel Twinkle gene mutation in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscular Disorders*. 13: 568–572.
- Desler C, Lykke A & Rasmussen I J (2010). The effect of mitochondrial dysfunction on cytosolic nucleotide metabolism. *Journal of Nucleic Acids*. Volume 2010: 1-9.
- Dogan R I, Getoor L, Wilbur W J & Mount S M. (2007). SplicePort - An interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Research*. 35: 285-291.
- Dunnem JT & Anronarakis S E (2000). Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. *Human Mutation*. 15: 7-12.
- Grazina M M M (2004). Genoma mitocondrial e déficit energético no diagnóstico das doenças da cadeia respiratória mitocondrial. coimbra: Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina. Tese de doutoramento.

Hakonen A H, Isohanni P, Paetau A, Herva R, Suomalainen A & Lönnqvist T (2007). RecessiveTwinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain*. 130:3032-3040.

Hirano M, Marti R, Barros C F, Vilà M R, Tadesse S, Nishigaki Y, Nishino I & Vu T H (2001). Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause. *Cell & Developmental Biology*. 12: 417 - 427.

Holt I J, Harding A E & Morgan-Hughes J A (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. 331: 717-719.

Houshamand M, Panahi M S, Hosseini B N, Dorraj G H & Tabassi A R (2006). Investigation on mtDNA deletions and Twinkle gene mutation (G1423C) in Iranian patients chronic progressive external ophthalmoplagia. *Neurology India*. 54(2): 182-185.

Jeppesen T D, Schwartz M , Colding-Jørgensen E, Krag T, Hauerslev S, Vissing J (2008). Phenotype and clinical course in a family with a new de novo Twinkle gene mutation. *Neuromuscular Disorders* 18: 306-309.

Karger B L & Guttman A (2009). DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. *National Institutes of Health Public Access*. 30(Suppl 1): 196–202.

Kent W J, Sugnet C W, Furey T S, Roskin K M, Pringle T H, Zahler A M, Haussler D (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Research*. 12(6): 996-1006.

- Korhonen J A, Gaspari M & Falkenberg M (2003). TWINKLE Has 5' – 3' DNA Helicase Activity and Is Specifically Stimulated by Mitochondrial Single-stranded DNA binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(49): 48627–48632.
- Lewis S, Hutchison W, Thyagarajan D & Dahl H M (2002). Clinical and molecular features of adPEO due to mutations in the Twinkle gene. *Journal of the Neurological Sciences*. 201: 39–44.
- Ma H, Shieh K J, Chen G, Qiao T X & Chuang M Y (2006). Application of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*. 2, 1-15.
- Mao C C & Holt I J (2009). Clinical and molecular aspects of diseases of mitochondrial DNA instability. *Chang Gung Medical Journal*. 32: 354-369.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*. 51(1): 263-273.
- Negro R, Zoccolella S, Dell'Aglio R, Amati A, Artuso L, Bisceglia L, Lavoipe V, Papa S, Serlenga L & Petruzzella V (2009). Molecular analysis in a family presenting with a mild form of late-onset autosomal dominant chronic progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscular Disorders*. 19: 423–426.
- Pacheu G D, Gómez D A, Montonya J & Ruiz P E (2010). Influence of mtdna genetic variation on antibiotic therapy. *Future Medicine*. 11(9): 1185-2416.
- Pettersson E, Lundeberg J & Ahmadian A (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics*. 93: 105–111.

Regateiro F J (2003). Manual de Genética Médica, 1ª ed. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra.

Saiki K R (1990). Amplification of genomic DNA. PCR protocols – a guide to methods and applications. *California Academic Press*. ISSN 0-12-372180-6. p.13-20.

Sarze E & Rötig A (2010). Instabilité du génome mitochondrial et pathologies associées. *Medecine/Sciences*. 26: 171-176.

Schapira A H V (2006). Mitochondrial disease. *The Lancet*. 368: 70-82.

Servidei S, Zeviani M, Manfredi G, Ricci E, Silvestri G, Bertini E, Gellera C, Di M S, Di D S & Tonali P (1991). Dominantly inherited mitochondrial myopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA: clinical, morphologic, and biochemical studies. *Neurology*. 41(7): 1053-9.

Shoffner J M, Lorrt M T, Voljavect A S, Soueidan S A, Costigan D A & Wallace D C (1989). Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: A slip-replication model and metabolic therapy. *Proceedings of the National Academy of Science*. 86: 7952-7956.

Spelbrink J N, Li F Y, Tiranti V, Nikali K, Yuan Q P, Tariq M, Wanrooij S, Garriol N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi G M, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalinen A, Jacobs H T, Zeviani m & Larsson C (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature*. 18: 223- 231.

Spinazzola A & Zeviani M (2009). Disorders from perturbations of nuclear mitochondrial intergenomic cross-talk. *Journal of Internal Medicine*. 265: 174-192.

Spinazzola A & Zeviani M (2005). Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene*. 354: 162 – 168.

Stellwagen N C (2009). Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *National Institutes of Health Public Access*. 30: 188–195.

Taylor R W & Turnbull D M (2007). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 6(5): 389-402.

Tuppen H A L, Blakely E L, Turnbull D M, Taylor R W (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797: 113 - 128.

Van Hove, J L K, Cunningham V, Rice C, Ringel S P, Zhang Q, Chou P C, Truong C K & Wong L J C (2009). Finding Twinkle in the Eyes of a 71-Year-Old Lady: A Case Report and Review of the Genotypic and Phenotypic Spectrum of TWINKLE-Related Dominant Disease. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 149A:861–867.

Verge B, Alonso Y, Valero J, Miralles C, Vitella E & Martorell L (2011). Mitochondrial DNA (mtDNA) and schizophrenia. *European Psychiatry*. 26: 45–56.

Wallace D C (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Interscience*. 51: 440-450.

Wallace D C, Singh G, Lott M T, Hodge J A, Schurr, Lezza A M, Elsas L J & Nikoskelainen E K (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 242(4884): 1427-1430.

Wanrooij S & Falkenberg M (2010). The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797: 1378–1388.

Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M & Fiehn W (1994). Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*. 22 (20): 4354-4355.

Wong L J C (2005). Molecular genetics of common mitochondrial DNA disorders. *Journal Of Peking University (Health Sciences)*. 37: 26-31.

Wong L J C (2010). Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Developmental Disabilities Research Reviews*. 16: 154 – 162.

Yuzaki M, Ohkoshi N, Kanazawa I, Kagawa Y & Ohta S (1989). Multiple deletions in mitochondrial DNA at direct repeats of non-D-loop regions in cases of familial mitochondrial myopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 164(3): 1352-1357.

Zeviani M & Antozzi C (1997). Mitochondrial disorders. *Molecular Human Reproduction*. 3(2): 133–148.

