



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Análise do Gene *DGUOK* em Crianças
com Síndrome de Depleção

Carla Isabel Teixeira de Jesus Pereira

2011



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Análise do Gene *DGUOK* em Crianças com Síndrome de Depleção

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Grazina (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e supervisão do Professor Doutor António Portugal (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Carla Isabel Teixeira de Jesus Pereira

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

Findo este trabalho é hora de agradecer a algumas pessoas que tornaram possível a sua realização:

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Manuela Grazina por ter aceite a orientação do meu trabalho. Obrigada por ouvir as minhas ideias, opiniões e incertezas, pelas críticas, correcções e sugestões dadas e por todos os conhecimentos que me transmitiu, que me fizeram crescer cientificamente. Agradeço também a autonomia que me deu, e o apoio e confiança que me mantiveram sempre motivada.

Ao Doutor Filipe Silva, por toda a ajuda no desenho do estudo, pelas discussões e sugestões fundamentais para a prossecução do meu trabalho.

Ao Professor Doutor António Portugal, pela co-orientação do meu trabalho, pela disponibilidade, pela ajuda e pela forma amável com que sempre me tratou.

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

Aos doentes, familiares e médicos envolvidos, pela cedência das amostras e dados sem os quais este estudo não seria possível.

Ao Dr. João Pratas e à Mestre Maria João Santos por todas as sugestões e ajuda prestada. À Carolina Ribeiro e à Daniela Luís pelo carinho e paciência com que sempre me ajudaram desde o primeiro dia. A vocês devo muito! À Catarina Bonifácio, Ana Teresa Viegas, Vera Baptista, Ana Raposo, André Marreiro, Rita Marreiros e Carlos Ferreira muito obrigada pelas gargalhadas, pela entre-ajuda que sempre houve, e pelas amizades formadas. Foi muito bom trabalhar ao vosso lado!

Aos restantes membros da equipa do laboratório, em especial à Dra. Marta Simões, o meu obrigado pela disponibilidade em ajudar!

À Sara Figueiredo, Mariline Silva, Isabel Ferreira, João Pedro Neto, e a todos os meus amigos e agradeço o apoio e incentivo que me têm dado ao longo desta caminhada e todos os momentos que já partilhámos.

E por último, mas não menos importantes, à minha mãe, ao meu pai, que infelizmente já não está entre nós, à minha irmã, aos meus padrinhos e prima, pelo apoio incondicional que me deram não só nesta, mas em todas as fases da minha vida.

A todos, muito obrigada... sem vocês não teria chegado aqui!

Índice

Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
Abreviaturas	x
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
1.1 Mitocôndria	4
1.1.1 Estrutura e Função.....	4
1.1.2 Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação Oxidativa.....	6
1.1.3 Genoma mitocondrial	7
1.1.3.1 Replicação do mtDNA	9
1.1.3.2 Transcrição do mtDNA	11
1.2. Citopatias Mitocondriais.....	11
1.3. Mutações no mtDNA e nDNA como causa de citopatias mitocondrias.....	14
1.3.1. Mutações no mtDNA	14
1.3.1.1. Síndrome de depleção do mtDNA	15
1.3.2. Mutações no nDNA	17
1.3.2.1. Síndrome de depleção e alterações no gene <i>DGUOK</i>	18
2. Objectivos	21
3. Material e Métodos	23

3.1. Amostragem	24
3.2. Métodos.....	27
3.2.1. Quantificação de DNA.....	27
3.2.2. Reacção da polimerase em cadeia (PCR).....	27
3.2.3. Electroforese em gel de agarose	32
3.2.4. Purificação de produtos da PCR de amplificação	33
3.2.5. PCR de sequenciação.....	34
3.2.6. Purificação dos produtos da PCR de sequenciação	34
3.2.7. Sequenciação automática de DNA.....	35
3.2.8. Análise de restrição enzimática	35
3.2.9. Análise de sequências e estudos <i>in silico</i>	36
4. Resultados.....	37
4.1. Amplificação dos fragmentos do gene <i>DGUOK</i> por PCR.....	38
4.2. Sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR.....	39
4.3. Análise <i>in silico</i> das alterações identificadas.....	45
4.4. Análise de restrição enzimática para confirmação de variações de sequência .	49
5. Discussão	52
6. Conclusão.....	60
Referências.....	63

Índice de Figuras

Figura 1. Mitocôndria e localização do processo respiratório.....	5
Figura 2. Complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial.....	6
Figura 3. Molécula de DNA mitocondrial humano.....	8
Figura 4. Hereditariedade materna como padrão de hereditariedade do genoma mitocondrial.....	9
Figura 5. Replicação do mtDNA humano.....	10
Figura 6. Órgãos e tecidos afectados pela MDS.....	17
Figura 7. Representação esquemática das principais vias enzimáticas mitocondriais envolvidas em mutações do mtDNA como a depleção.....	20
Figura 8. PCR.....	29
Figura 9. Electroforese em gel com 1% de agarose evidenciando fragmentos do gene <i>DGUOK</i> amplificados	38
Figura 10. Exemplo de um electroferograma visualizado no <i>software SeqScape®</i> v.2.5.....	39
Figura 11. Electroferograma evidenciando a alteração c.353G>A.....	42
Figura 12. Electroferogramas evidenciando a alteração c.749T>C.....	43
Figura 13. Electroferogramas evidenciando a alteração c.677A>G.....	44
Figura 14. Electroferograma evidenciando a variação de sequência c.509A>G.....	44
Figura 15. Resultados da análise do impacto das mutações <i>missense</i> encontradas no estudo do gene <i>DGUOK</i>	46
Figura 16. Resultado da análise <i>in silico</i> para verificação da alteração de splicing para a variação de sequência c.*13A>T.....	48
Figura 17. Amostras com alterações no gene <i>DGUOK</i> com previsibilidade patogénica	48
Figura 18. Proporção de alterações homocigóticas e heterocigóticas encontradas	48

Figura 19. A - Heredograma para a alteração c.677A>G da doente 3. B - Heredograma da família do doente 4 para a alteração c.749T>C.....49

Figura 20. Resultados da análise de restrição por PCR-RFLP.50

Índice de Tabelas

Tabela I. Falhas na comunicação intergenómica: Classificação clínica e genética.	13
Tabela II. Dados clínicos dos doentes estudados.	26
Tabela III. Caracterização dos <i>primers</i> utilizados para amplificar o gene <i>DGUOK</i>	31
Tabela IV. Enzimas utilizadas para confirmação das alterações detectadas.	36
Tabela V. Alterações encontradas no gene <i>DGUOK</i>	41

Abreviaturas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
A	Adenina
AD	Autossómico Dominante
ADP	<i>Adenosine Diphosphate</i> – Adenosina Difosfato
ANT1	<i>Muscle/Heart Adenine Nucleotide Translocators</i> - Translocadores de Nucleótidos de Adenina no Músculo/Coração
AR	Autossómico Recessivo
ATP	<i>Adenosine Tri-phosphate</i> – Adenosina Tri-fosfato
ATPase	Enzima que cataliza a hidrólise de Adenosina Trifosfato
Bp	<i>Base Pairs</i> – Pares de Bases
C	Citosina
Ca²⁺	ião cálcio
CNC/UC	Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra
CRM	Cadeia Respiratória Mitocondrial
ddNTP	<i>Di-deoxy-ribonucleoside Tri-phosphate</i> – Di-desoxi-ribonucleótido Tri-fosfato (N=A, G,T,C)
DGUOK	<i>Deoxy-guanosine Kinase</i> – Desoxi-guanosina Cinase
DGUOK	<i>Gene DGUOK</i>
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	<i>Deoxy-ribonucleic acid</i> - Ácido desoxi-ribonucleico
dNTP	<i>Deoxy-ribonucleoside Tri-phosphate</i> – Desoxi-ribonucleótido Tri-fosfato (N=A, G, T, C)

EDTA	<i>Ethylene-diamine-tetra-acetic Acid</i> – Ácido Etileno-diamino-tetra-acético
FADH₂	<i>Reduced Flavin Adenine Dinucleotide</i> – Dinucleótido de flavina e adenina reduzido
FMUC	Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
G	Guanina
H⁺	ião hidrogénio
H₂O	Água
HC	<i>mtDNA Heavy Chain</i> – Cadeia pesada do mtDNA
IOSCA	<i>Infantile Onset Spinocerebellar Ataxia - Ataxia Espinocerebelosa Infantil</i>
LB	<i>Loading buffer</i>
LBG	Laboratório de Bioquímica Genética
LC	<i>mtDNA Light Chain</i> – Cadeia leve do mtDNA
LHON	<i>Leber's hereditary optic neuropathy</i> – Atrofia óptica hereditária de Leber
MDS	<i>mtDNA Depletion Syndrome</i> – Síndrome de Depleção do mtDNA Mitochondrial
MEM	Membrana Externa Mitochondrial
MERRF	<i>Myoclonus Epilepsy with Ragged-Red Fibres</i> – Epilepsia mioclónica com fibras vermelhas rotas
Mg²⁺	ião magnésio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MIM	Membrana Interna Mitochondrial
MI	Mililitro
mM	Milimolar
mtDNA	DNA Mitochondrial

mtSSBP	<i>Mitochondrial single stranded binding proteins</i> – Proteínas que se ligam ao mtDNA de cadeia simples
N	Número de Indivíduos
NAD⁺	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> – Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH⁺	<i>Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> – Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
nDNA	DNA nuclear
Nm	Nanómetros
°C	Graus Celsius
O_H	Origem de replicação da HC
O_L	Origem de replicação da LC
OPA1	<i>Optic atrophy 1</i> – Atrofia Óptica 1
OXPHOS	<i>Oxidative Phosphorylation</i> – Fosforilação oxidativa
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reacção da Polimerase em Cadeia
PEO	<i>Progressive External Ophthalmoplegia</i> - Oftalmoplegia Externa Progressiva
P_H	Promotor da HC
P_i	Fosfato inorgânico
P_L	Promotor da HL
POLG	<i>Mitochondrial polymerase gamma</i> – Polimerase gama mitocondrial
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
RRM2B	<i>P53- inducible ribonucleotide reductase</i> - P53-Ribunucleótido reductase indutível
rRNA	RNA ribossomal

SMA	<i>Spinal Muscular Atrophy</i> – Atrofia Muscular Espinhal
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Nucleótido Único
ssDNA	<i>Single-Stranded DNA</i> – DNA de cadeia simples
SUCLA2	<i>β-subunit of ADP-forming succinyl Coenzyme A synthetase ligase</i> – Subunidade β da succinil-CoA sintetase ligase formadora de ADP
SUCLG1	<i>β-subunit of succinyl Coenzyme A ligase</i> – Subunidade β da succinil-CoA ligase
T	Timina
TBE	Tampão Tris/Borato – EDTA
TK2	<i>Thymidine Kinase 2</i> - Timidina Cinase 2
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>
tRNA	RNA de transferência
TWINKLE	Helicase do mtDNA
TYMP	<i>Thymidine Phosphorylase</i> - Timidina Fosforilase
UV	Ultravioleta

Resumo

As citopatias mitocondriais englobam um vasto grupo de doenças multissistêmicas associadas a disfunções mitocondriais e afectam essencialmente tecidos e órgãos com elevada dependência do metabolismo energético.

A síndrome de depleção do DNA mitocondrial (MDS) é caracterizada por uma redução acentuada ($\leq 30\%$) do número de cópias de mtDNA, que pode ocorrer em diferentes tecidos e levar à síntese deficiente dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, tendo como consequência disfunções ao nível do processo de fosforilação oxidativa e défices na produção de energia. A MDS é caracterizada frequentemente por um padrão de hereditariedade autossómico recessivo, distinguindo-se três apresentações clínicas principais: miopática, encefalomiopática e hepatocerebral.

O gene *DGUOK* codifica uma nucleósido cinase mitocondrial, a desoxi-guanosina cinase, responsável pela fosforilação de desoxi-ribonucleótidos purínicos. Mutações neste gene têm sido indicadas como causa de MDS, principalmente em casos de envolvimento hepático e cerebral. Estas alterações podem reduzir substancialmente a actividade da enzima, levando a complicações ao nível dos processos de replicação, transcrição e manutenção do mtDNA.

Este trabalho teve como objectivo a sequenciação do gene *DGUOK* em 17 doentes com possível MDS. A análise das sequências permitiu identificar 11 alterações: 5 localizadas na região codificante do gene (4 mutações *missense* e 1 silenciosa), 4 localizadas na região intrónica, 1 no promotor e 1 na região 3'UTR. As quatro alterações *missense* são provavelmente patogénicas e encontram-se em homozigotia em 3 doentes, sendo a causa provável do fenótipo clínico. O presente estudo representa um contributo importante no estudo genético da MDS, tendo contribuído para a implementação da análise do gene *DGUOK* para diagnóstico no laboratório de acolhimento.

Abstract

Mitochondrial cytopathies comprise a broad group of multisystem disorders associated with mitochondrial dysfunction and it affects mainly tissues and organs with high dependence of energy metabolism.

The mitochondrial DNA depletion syndrome (MDS) is characterized by a marked reduction ($\leq 30\%$) in mtDNA copy number, which can occur in different tissues, leading to a defective synthesis of mitochondrial respiratory chain complexes, and consequently to dysfunction of the oxidative phosphorylation process and deficient energy production. MDS is characterized by an autosomal recessive pattern of inheritance, with three main clinical presentations: myopathic, encephalomyopathic and hepatocerebral.

DGUOK gene encodes a mitochondrial nucleoside kinase, the deoxy-guanosine kinase, responsible for phosphorylation of purine deoxy-ribonucleotide. Mutations in this gene have been proposed as a cause of MDS, especially in cases involving liver and central nervous system. These changes can substantially reduce the enzyme activity, leading to complications in replication, transcription and mtDNA maintenance processes.

This work aimed to sequence the *DGUOK* gene in 17 patients with possible MDS. The sequence analysis identified 11 alterations: five located in the gene coding region (4 missense mutations and 1 silent), 4 located in intron region, 1 located in promoter region and 1 in the 3'UTR. The four missense changes are probably pathogenic and are homozygous in 3 patients, being the probable cause of the clinical phenotype.

This study represents an important contribution in the genetic study of MDS, and it has contributed to the implementation of *DGUOK* gene analysis for diagnosis in the host laboratory.

1.Introdução

1.1 Mitocôndria

1.1.1 Estrutura e Função

A mitocôndria, um dos organelos mais importantes, encontra-se em todas as células eucarióticas dependentes de metabolismo aeróbio, geralmente no citoplasma, e desempenha funções extremamente importantes, tais como a fosforilação oxidativa (OXPHOS), ciclo de Krebs, β -oxidação dos ácidos gordos e a síntese de lípidos e colesterol, fornecendo substratos energéticos [adenosina trifosfato (ATP)] para as diversas funções celulares. Este organelo tem também um papel crucial ao nível da regulação de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma, participa em funções celulares como a sinalização, tem um papel importante na regulação da morte celular por apoptose, e está envolvido na metabolização de vários compostos (Simons *et al.*, 1999; Grazina, 2004; Lehninger *et al.*, 2005).

Em termos estruturais, a mitocôndria é oval e alongada, podendo medir no máximo 1 μm de largura e 10 μm de comprimento. Estes organelos celulares são constituídos por membrana mitocondrial externa (MEM), membrana mitocondrial interna (MIM), espaço intermembranar e matriz mitocondrial (Figura 1). As MEM e MIM são duas membranas fosfolípídicas que delimitam a mitocôndria, sendo a primeira lisa, enquanto que a segunda possui vilosidades, denominadas de cristas mitocondriais, que são protuberâncias que permitem aumentar de forma considerável a sua superfície. É na MIM que se localizam as subunidades dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). O espaço intermembranar refere-se ao espaço existente entre as membranas externa e interna e é rico em proteínas. O DNA mitocondrial (mtDNA) - material genético próprio destes organelos, os ribossomas e outras proteínas são encontradas no

espaço intra-mitochondrial, usualmente denominado de matriz mitochondrial (Schapira, 2006).

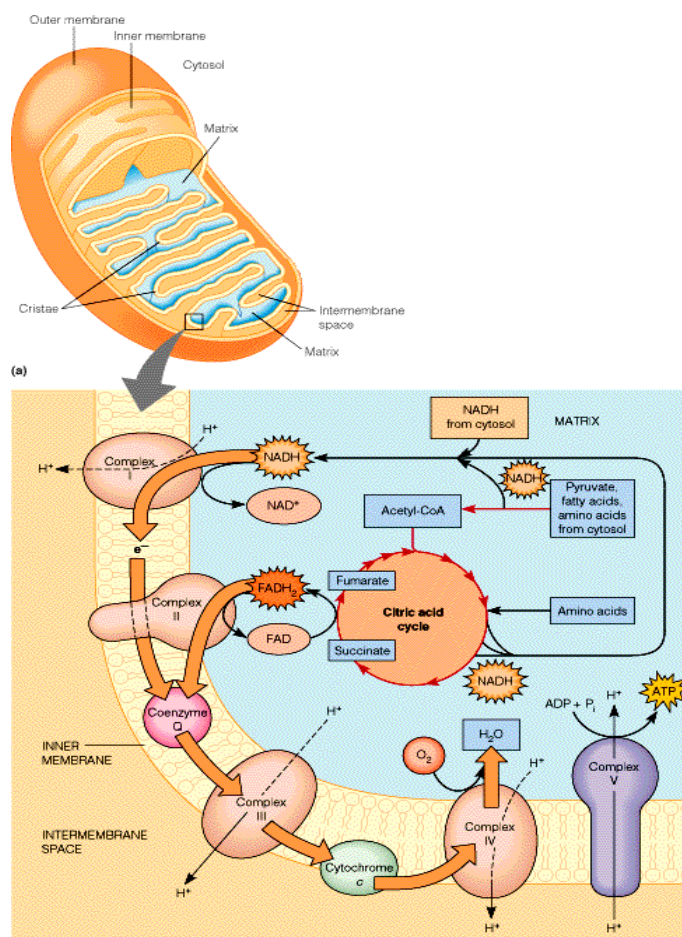


Figura 1. Mitocôndria e localização do processo respiratório.

Representação dos principais componentes estruturais da mitocôndria: MEM, MIM, espaço intermembranar, cristas mitocondriais e matriz. Neste organelo ocorrem reacções de elevada importância para a célula, destacando-se a fosforilação oxidativa, que é catalizada pelas enzimas do sistema da CRM, e o ciclo de Krebs entre outras (adaptado de Mathews *et al.*, 1999).

A densidade mitocondrial é variável consoante as diferentes necessidades energéticas dos tecidos. Estima-se que existam cerca de 10 a 100.000 organelos por célula (Grazina, 2004)

1.1.2 Cadeia Respiratória Mitocondrial e Fosforilação Oxidativa

A OXPHOS, processo que ocorre ao nível da CRM, é a maior fonte de produção de moléculas de ATP nas células. Estas moléculas, ao serem degradadas, fornecem energia, essencial para a ocorrência de muitas reacções a nível celular (Grazina, 2004).

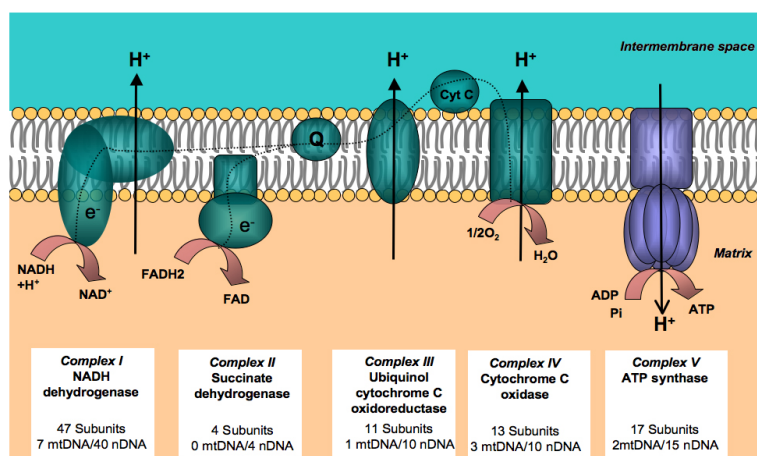


Figura 2. Complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial. A CRM é composta por quatro complexos enzimáticos (Complexos I, II, III e IV) e dois substratos intermediários (coenzima Q e citocromo c). Os intermediários metabólicos NADH^+ e FADH_2 ao serem oxidados, contribuem para o gradiente electroquímico de prótons, permitindo assim a síntese de ATP através da F_1F_0 -ATP sintase (complexo V) por condensação ADP com fosfato inorgânico. (adaptado de Nadege *et al.* 2009).

A CRM é composta por um conjunto de complexos localizados, como referido anteriormente, na MIM. É através deles que os electrões são transportados unidireccionalmente até ao seu aceitador final, o oxigénio (O_2), levando à formação de moléculas de água (H_2O). O gradiente de prótons que ocorre ao nível da MIM (nos complexos I, III e IV) vai permitir formar ATP a partir de adenosina difosfato

(ADP) e fosfato inorgânico (Figura 2). Formam-se três moléculas de ATP por cada NADH oxidado, e duas por cada FADH₂ (Lodish *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2010). O sistema multienzimático é regulado por dois genomas, o genoma nuclear e o mitocondrial.

1.1.3 Genoma mitocondrial

O mtDNA humano, material genético distinto do DNA nuclear (nDNA), é uma molécula circular de dupla cadeia, constituída por 16.568 pares de bases (pb), encontrando-se numa proporção de 5 a 10 cópias por mitocôndria (Figura 3) (Nadege *et al.*, 2009; Grazina, 2004). As suas cadeias foram descritas como cadeia leve (LC) e cadeia pesada (HC), de acordo com o seu conteúdo em G≡C (G (guanina) estabelece 3 pontes de hidrogénio com C (citosina)), que é mais elevado na cadeia pesada (Larsson *et al.*, 1998).

O mtDNA codifica apenas 37 genes, dos quais 13 codificam mRNA para formar 13 subunidades da CRM, 22 para RNA de transferência (tRNA) e 2 para RNA ribossómico (rRNA) (12S e 16S). As 24 moléculas de RNA (tRNA e rRNA) vão ser usadas para a tradução dos 13 peptídeos da CRM (7 subunidades do complexo I, 1 subunidade do complexo III (citocromo *b*), 3 subunidades do complexo IV (COX I, II e III) e 2 subunidades do complexo V (ATPase 6 e 8). As subunidades do complexo II são todas codificadas pelo genoma nuclear (Wong, 2007; Grazina, 2004).

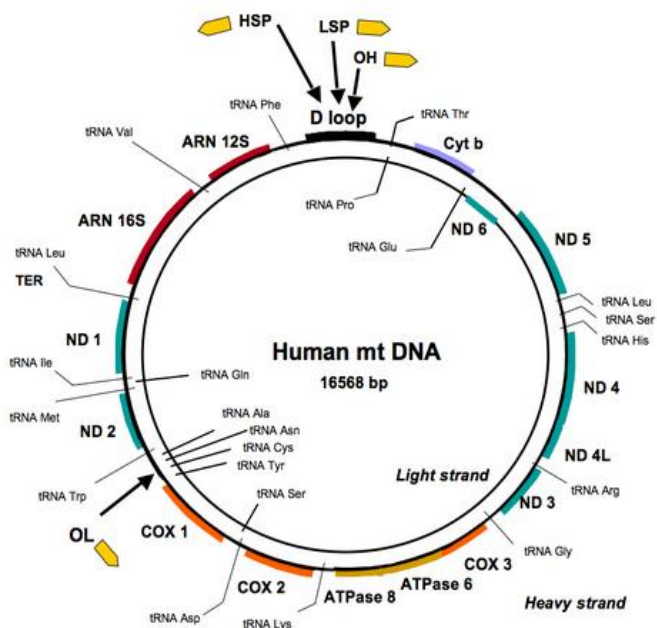


Figura 3. Molécula de DNA mitocondrial humano. O mtDNA humano, molécula contida por 16.568 pb, codifica 37 genes e possui diversas seqüências de regulação da transcrição e tradução (adaptado de Nadege *et al.* 2009).

As seqüências codificantes do mtDNA não têm interrupções. No entanto, embora o mtDNA não possua intrões, existem duas zonas não codificantes, bem como as seqüências relativas à origem de replicação da LC (O_L), o D-loop e a origem de replicação da HC (O_H). Esta particularidade pode ser considerada, por um lado, uma vantagem, se tivermos em conta o *empacotamento* deste genoma, mas por outro lado, uma desvantagem, se tivermos em consideração a elevada taxa de mutações em comparação com o nDNA, uma vez que por possuir quase totalmente seqüências codificantes, a probabilidade de ocorrer alguma alteração que se venha a revelar nefasta é maior (Grazina, 2004).

A hereditariedade do mtDNA ocorre por via materna e não sofre recombinação, o que faz com que mutações ou polimorfismos existentes se possam acumular ao longo da linhagem materna (Figura 4) (Grazina, 2004; Schapira, 2006).

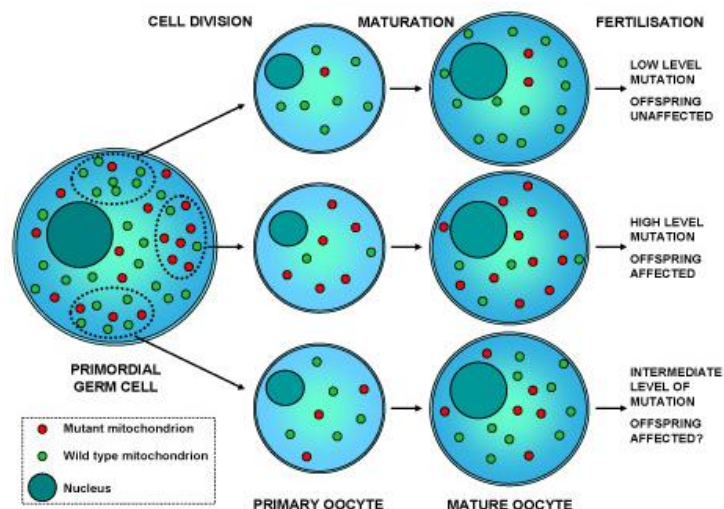


Figura 4. Hereditariedade materna como padrão de hereditariedade do genoma mitocondrial (adaptado de http://www.mitochondrialncg.nhs.uk/pa_genetics.html).

1.1.3.1 Replicação do mtDNA

A síntese de mtDNA ocorre de forma independente do ciclo celular. No entanto, é dependente de desoxi-nucleótidos que provêm do citoplasma para assegurar a sua síntese (Rahman & Poulton, 2009).

O mtDNA está continuamente a ser replicado. Este possui um mecanismo de replicação bidireccional, através da qual se originam duas cadeias, HC e LC. No processo de replicação participam várias enzimas. O início da replicação ocorre a partir da O_H (Figura 5), localizada no *D-loop* sendo o primeiro interveniente a enzima TWINKLE, uma helicase que tem como função desenrolar a cadeia de mtDNA para que a replicação se possa iniciar. Outros intervenientes neste processo são também a DNA polimerase γ (POLG) e as mtSSBP (proteínas que se ligam ao mtDNA de cadeia simples- *mitochondrial single stranded DNA binding*

protein). A POLG é responsável pela fidelidade da replicação do mtDNA, enquanto as mtSSBP são proteínas que se vão ligar ao mtDNA de cadeia simples, promovendo a sua estabilização, facilitando e aumentando, assim, a actividade da POLG (Hudson & Chinnery, 2006; Falkenberg *et al.*, 2007). Aquando da finalização da replicação da primeira cadeia, a cadeia HC, a cadeia seguinte começa a ser replicada na direcção contrária, ocorrendo desta forma a replicação do DNA em duas direcções. É no final da síntese destas duas novas cadeias que intervém mais uma enzima importante, a DNA ligase, que vai permitir que a nova molécula tome a forma circular, obtendo-se assim, finalmente, uma molécula de DNA semelhante à que lhe serviu de molde (Schapira, 2006; Grazina, 2004).

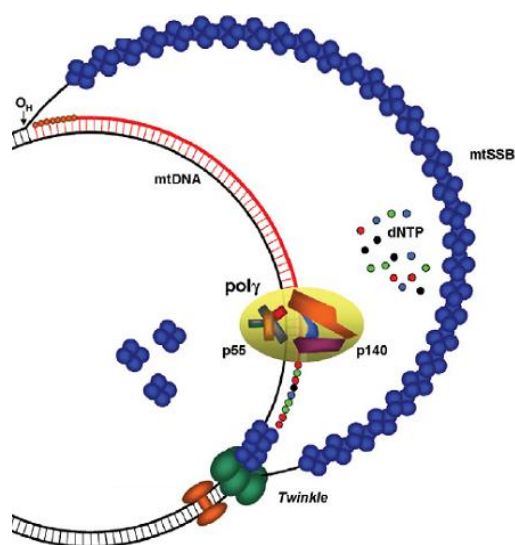


Figura 5. Replicação do mtDNA humano. Encontram-se representados na figura os componentes-chave necessários no replicação do mtDNA (adaptado de Hudson & Chinnery, 2006).

1.1.3.2 Transcrição do mtDNA

Para que o processo de transcrição se possa realizar é necessária a importação, por parte da mitocôndria, de factores de iniciação, alongação e transcrição.

A transcrição vai ocorrer de forma assimétrica, a partir dos promotores das cadeias leve e pesada, designados, respectivamente por P_L e P_H . Estes promotores estão localizados no *D-loop* (região hipervariável) e funcionam em direcções contrárias, sendo a cadeia O_H aquela que é transcrita no sentido inverso ao dos ponteiros do relógio. A transcrição vai gerar um transcrito primário com um tamanho relativamente grande, que vai ser clivado, libertando assim os tRNAs e os rRNAs associados (Grazina, 2004).

1.2. Citopatias Mitocondriais

Decorria o ano de 1962, quando o termo doenças mitocondriais foi introduzido por Luft e seus colaboradores (Luft *et al.*, 1962). No entanto, a designação citopatias mitocondriais surge mais tarde, em 1996, por Munnich e colaboradores (Munnich *et al.*, 1996). Entre as mais conhecidas estão a atrofia óptica hereditária de Leber (LHON), a epilepsia mioclónica com fibras vermelhas rotas (MERRF) e a oftalmoplegia externa progressiva (PEO) de transmissão materna.

As citopatias mitocondriais, constituem um grupo de doenças muito heterogéneo, possuindo manifestações clínicas e bioquímicas extremamente variadas, caracterizando-se essencialmente por alterações funcionais das mitocôndrias que levam à disfunção da CRM (Grazina, 2004). As disfunções

mitocondriais herdadas, podem ser resultado de mutações nos dois genomas. Este grupo de doenças apresenta diferentes tipos de hereditariedade e abrange todas as faixas etárias (Hudson & Chinnery, 2006; Fellman *et al.*, 2011). Os primeiros sintomas podem surgir em qualquer idade, podendo regredir, avançar mais lentamente ou mais rapidamente, ou podendo mesmo ser fatais.

As patologias mitocondriais podem afectar diferentes tecidos e órgãos, advindo daí a grande variedade de sintomas que apresentam (Tabela I). No entanto, os órgãos mais afectados são muitas vezes aqueles que têm elevadas necessidades energéticas, como o cérebro, o coração, o músculo esquelético ou o fígado (Jonhs, 1995). Outros órgãos como o pâncreas, os olhos e os rins, também podem ser afectados.

A grande heterogeneidade clínica deste tipo de patologias deve-se ao facto da CRM ser controlada por dois genomas distintos, o genoma nuclear e o genoma mitocondrial, mas deve-se também ao facto de haver um elevado número de moléculas de mtDNA em cada célula, e de estas poderem coexistir na variante *wild type* e/ou em mutante num mesmo tecido e/ou órgão, dado que se sabe que a distribuição do mtDNA é aleatória (Cohen & Gold, 2001; Alberio *et al.*, 2007).

Para além dos estudos genéticos, que envolvem técnicas como a sequenciação automática ou a reacção da polimerase em cadeia (PCR) com uso de enzimas de restrição (PCR-RFLP), os estudos bioquímicos que se podem realizar ao nível da CRM oferecem também um excelente contributo na compreensão destas patologias (Wong & Boles, 2005).

Tabela I. Falhas na comunicação intergenômica: Classificação clínica e genética (adaptado de Spinazzola e Zeviani, 2009).

Gene	Produto do gene	Alterações do Fígado	Alterações do Músculo	Alterações do Sistema Nervoso	Outras alterações	Alterações no mtDNA	H.
POLG1	Subunidade catalítica da polimerase γ mitocondrial	Insuficiência hepática	Miopatia, oftalmoplegia externa	Poliodistrofia, ataxia, epilepsia parcial contínua	Hepatotoxicidade ao valproato	Deleções múltiplas, depleção	AD AR
TWINKLE	Helicase do mtDNA	Insuficiência hepática	Miopatia, hipotonia, oftalmoplegia	Atetose, neuropatia sensorial, ataxia, epilepsia	IOSCA	Deleções múltiplas, depleção	AD AR
ANT1	Translocador de nucleótidos de adenina no músculo/coração	-	Miopatia, PEO, intolerância ao exercício	-	Cardiomiopatia hipertrófica	Deleções múltiplas	AD AR
TYMP	Timidina fosforilase	-	Miopatia, hipotonia, oftalmoplegia	Leucoencefalopatia, neuropatia	Motilidade gastrointestinal com pseudo-obstrução	Deleções múltiplas, depleção	AR
OPA1	Dinamina GTPase	-	PEO, neuropatia periférica	Atrofia óptica, ataxia	-	Deleções múltiplas	AD
DGUOK	Desoxiguanosina cinase	Hipoglicemia, Insuficiência hepática	Hipotonia	<i>Nistagmus</i> , movimentos distônicos	-	Depleção	AR
MPV17	Função ainda não conhecida	Hipoglicemia, Insuficiência hepática	Hipotonia	Ataxia, neuropatia, movimentos distônicos	Opacidade da córnea, atraso mental, escoliose	Depleção	AR
TK2	Timidina cinase	-	Miopatia, creatina cinase elevada	PEO ocasional, convulsões	SMA-1, SMA-3, distrofia muscular	Depleção	AR
RRM2B	P53-Ribonucleótido redutase induzível	-	Hipotonia do tronco	Microcefalia e atraso no desenvolvimento global, perda auditiva	Tubulopatia, nefrocalcinose	Depleção	AR
SUCLG1	Subunidade β da succinil-CoA ligase	Hepatomegalia	Hipotonia, acidose láctica	-	Dimorfismo, acidúria metilmalônica	Depleção	AR
SUCLA2	Subunidade β da succinil-CoA sintetase ligase-formadora de ADP	-	Hipotonia, acidose láctica	Síndrome de Leigh, distonia	Surdez, acidúria metilmalônica	Depleção	AR

Legenda: AD-Autossômico Dominante; ADP- Adenosina Di-fosfato; AR-Autossômico Recessivo; H.- Padrão de hereditariedade; IOSCA- Ataxia Espinocerebelosa Infantil; mtDNA- DNA mitocondrial; PEO- Oftalmoplegia externa progressiva; SMA- Atrofia Muscular Espinhal

Nas últimas décadas, com os enormes avanços da Biologia Molecular, foi possível alcançar novos conhecimentos no estudo das citopatias mitocondriais. Contudo, alguns mecanismos e o papel patogénico de muitas mutações continua ainda por esclarecer. Ainda por clarificar continua também a relação entre a mitocôndria e determinadas patologias/processos, tais como as doenças neurodegenerativas e o envelhecimento (DiMauro, 2004).

1.3. Mutações no mtDNA e nDNA como causa de citopatias mitocondrias

A mitocôndria, apesar de possuir o seu próprio DNA, depende de factores codificados pelo nDNA para a sua replicação, reparação, transcrição e tradução, o que faz com que o mtDNA não seja totalmente autónomo (Grazina, 2004). Esta dependência acaba por influenciar a manifestação de determinadas patologias humanas, que se caracterizam por alterações no mtDNA (Chan *et al.*, 2008), consequentes de erros em factores codificados pelo nDNA, como é o caso da síndrome de depleção do mtDNA (MDS). As causas de uma grande parte das citopatias mitocondriais são as mutações em genes nucleares que codificam subunidades da CRM ou, ainda, que codificam factores de processamento essenciais para o mtDNA.

1.3.1. Mutações no mtDNA

O mtDNA encontra-se em proximidade com a MIM, onde está localizada a CRM, que é a principal fonte celular de radicais livres de oxigénio, gerados pela

fosforilação oxidativa. Existem também diversas enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos e xenobióticos em geral, associados à MIM, o que pode contribuir para que se verifique uma maior taxa de mutações no mtDNA. A ausência de histonas, que poderiam ter um efeito protector, é outro factor que contribui para que se verifique uma taxa de mutações mais elevada neste genoma. Para além destes factos, é ainda de referir que os mecanismos de reparação que o mtDNA possui são pouco eficientes. Estima-se que a taxa de ocorrência de mutações seja 10 vezes maior comparativamente ao nDNA (DiMauro, 2004).

São vários os tipos de mutações que podem atingir o genoma mitocondrial: mutações pontuais, deleções, rearranjos (duplicações e inserções) e depleção (Munnich *et al.*, 2001). De todas, a depleção, é a única que não inclui alterações na cadeia de mtDNA, variando neste caso apenas o número de cópias de mtDNA.

A heteroplasmia, uma das características mais importantes do mtDNA, consiste na ocorrência, em simultâneo, de moléculas de mtDNA mutante (ou com variação de sequência não mutante) e normal na mesma mitocôndria (Grazina, 2004). É esta peculiaridade que justifica que a expressão fenotípica de uma alteração no mtDNA dependa da sua proporção relativa dentro de cada célula, característica essa que implica a existência de um limiar de expressão, ou seja, pode existir um certo número de moléculas mutadas sem que se manifeste o fenótipo bioquímico e/ou clínico (Schapira, 2006).

1.3.1.1. Síndrome de depleção do mtDNA

A MDS é uma doença mitocondrial que foi descrita por Moraes e colaboradores (Moraes *et al.* em 1991). Esta síndrome caracteriza-se por uma redução drástica no número de cópias de mtDNA (Rahman & Poulton, 2009),

ocorrendo num ou mais tecidos, e que tem como consequência disfunções na CRM, em particular nos complexos I, III, IV e V, (Naviaux *et al.*, 2004) mas podendo também afectar o complexo II ou deficiências múltiplas (Sarzi *et al.*, 2007; Scaglia, 2001).

O padrão de hereditariedade da MDS é, maioritariamente, autossómico recessivo, tendo também já sido encontradas outras formas de hereditariedade (Spinazzola *et al.*, 2009). Esta síndrome, que tal como as restantes citopatias mitocondriais, pode afectar vários tecidos e órgãos, resulta de defeitos em factores codificados pelo DNA nuclear (nDNA), envolvidos na manutenção e replicação do mtDNA, tais como, anomalias na desoxi-guanosina cinase (EC 2.7.1.113) ou na DNA polimerase mitocondrial ou défice de desoxi-nucleótidos tri-fosfatados (dNTPs) mitocondriais (Spinazzola & Zeviani, 2009; Rahman & Poulton, 2009).

Em geral, a MDS pode apresentar-se sob três formas principais: miopática (OMIM#609560), encefalomiopática (OMIM#612073) ou hepatocerebral (OMIM#251880). A forma hepatocerebral é a mais comum. O seu aparecimento dá-se muito cedo, em período neo-natal ou infantil, surgindo frequentemente nos primeiros 6 meses de vida, sendo fatal numa grande parte dos casos antes do primeiro ano de idade. Esta forma da MDS tem sido associada a alterações nos genes *DGUOK*, *POLG1* e *MPV17*.

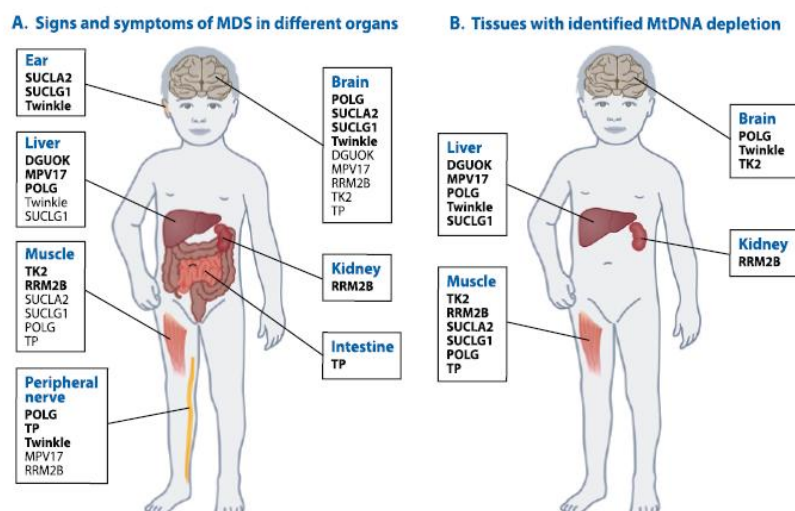


Figura 6. Órgãos e tecidos afetados pela MDS. Em A estão representados os órgãos mais afetados pela MDS e os respectivos genes associados. Em B estão evidenciados os tecidos maioritariamente identificados com depleção do mtDNA e os genes associados a cada tecido (adaptado de Suomalainen & Isohanni, 2010).

1.3.2. Mutações no nDNA

A maior parte das citopatias mitocondriais é causada por mutações no genoma nuclear. Na Tabela I estão representados muitos dos genes nucleares que, quando alterados, contribuem para mutações do mtDNA, como depleção e/ou deleções múltiplas. Estas alterações, maioritariamente herdadas de forma recessiva, provocam patologias ao nível muscular, hepático, sistema nervoso, entre outras (Figura 6).

1.3.2.1. Síndrome de depleção e alterações no gene *DGUOK*

A MDS tem vindo a ser associada a alterações no gene da desoxi-guanosina cinase, particularmente em situações em que se verifica um quadro clínico que inclua envolvimento hepático e do sistema nervoso central. O músculo pode também estar comprometido no que diz respeito às suas funções (Ji *et al.*, 2010; Dimmock *et al.*, 2007)

Mutações no gene *DGUOK* podem reduzir ou eliminar a actividade da enzima desoxi-guanosina cinase, surgindo problemas a nível dos processos de replicação, transcrição e manutenção do mtDNA. A consequente depleção do mtDNA irá prejudicar a função mitocondrial em tecidos e órgãos, particularmente naqueles que revelam maior gasto energético, como já foi referido anteriormente.

A desoxi-guanosina cinase e a timidina cinase são as enzimas da via de produção de nucleótidos mitocondriais que fornecem os desoxi-ribonucleótidos essenciais para a síntese de mtDNA na mitocôndria (Saada-Reisch, 2004). Os desoxi-ribonucleótidos mitocondriais constituem o maior recurso de precursores do mtDNA em órgãos ou tecidos mitoticamente estáveis, como os do fígado, do cérebro ou do músculo.

Algumas das manifestações clínicas mais frequentes resultantes da MDS, quando causada por defeitos no gene *DGUOK* incluem: hipoglicémia, insuficiência hepática, hipotonia, *nistagmus* e movimentos distónicos (Tabela I). O gene *DGUOK*, à semelhança do *MPV17*, relaciona-se essencialmente com patologias do fígado e sistema nervoso. A hipotonia caracteriza-se pela apresentação de um tónus muscular anormalmente baixo e, conseqüentemente, uma redução da força muscular. O *Nistagmus* é uma apresentação clínica caracterizada por movimentos rítmicos, involuntários e conjugados dos globos oculares. Há alternância entre

oscilações rápidas e oscilações lentas. A distonia, por sua vez, define-se pela paragem brusca do movimento devida a contrações musculares involuntárias.

Actualmente, ainda não existe tratamento para a MDS. No entanto, no caso de indivíduos que apresentavam simultaneamente um quadro de *nistagmus* e disfunção hepática, existem registos da sua condição ter melhorado através de transplante hepático (Dimmock *et al.*, 2008).

Em 1996, Magnus Johansson e sua equipa publicaram a descoberta da localização genética do gene da desoxi-guanosina cinase humana. O gene *DGUOK* foi identificado no braço curto do cromossoma 2, região 1, banda 3 (2p13) (Johansson *et al.*, 1996). Este gene *DGUOK* codifica a desoxi-guanosina cinase, uma nucleósido cinase mitocondrial, que tem como função fosforilar os desoxi-ribonucleósidos purínicos desoxi-guanosina, desoxi-inosina e desoxi-adenina (Arnér & Eriksson, 1995).

São actualmente conhecidas 2 isoformas diferentes do gene *DGUOK*, a isoforma NM_080916.1 e a isoforma NM_080918.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1716>). A enzima produzida tem uma função muito importante para a manutenção do mtDNA, tendo sido associada à depleção do mtDNA, quando o gene possui mutações, que levam a que a sua produção se processa de forma incorrecta. (Ji *et al.*, 2010; Brahim *et al.*, 2009; Saada-Reish, 2004;)

A desoxi-guanina e a desoxi-adenosina são importadas do espaço extra-mitocondrial, e, por acção da enzima desoxi-guanosina cinase, a enzima codificada pelo gene *DGUOK*, vai catalisar a formação dos desoxi-nucleótidos monofosfatados (dNMPs) desoxi-guanosina e desoxi-adenosina monofosfatadas. A estes vai ser adicionado fosfato inorgânico (P_i), indo depois esses dNTPs ser integrados na replicação ou transcrição do mtDNA. Quando há perturbação deste controlo homeostático, por exemplo por defeitos nos genes *DGUOK*, *TK2*, *TYMP*, *RRM2B*,

ANT1, a proteína produzida é deficiente podendo ocorrer depleção do mtDNA ou deleções múltiplas (Spinazzola & Zeviani, 2009).

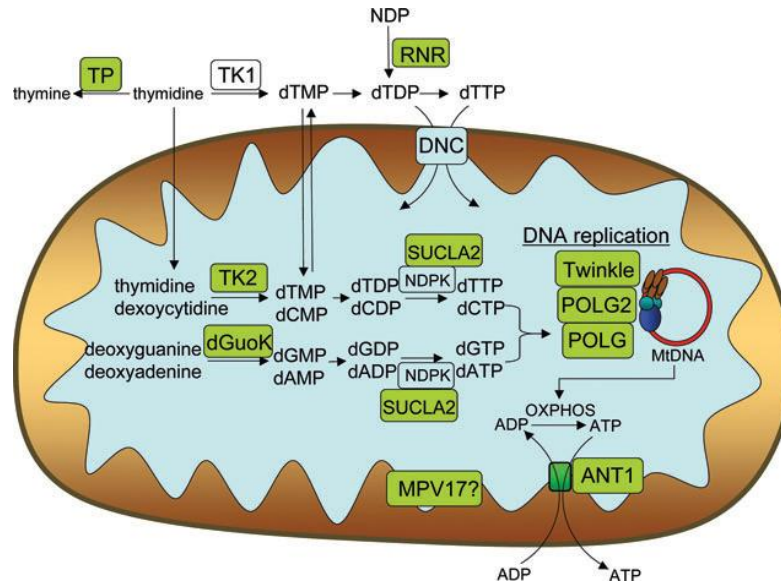


Figura 7. Representação esquemática das principais vias enzimáticas mitocondriais envolvidas em mutações do mtDNA como a depleção. Os genes associados à depleção do mtDNA encontram-se representados em caixas verdes (adaptado Copeland, 2008).

No presente estudo, ir-se-á dar mais ênfase à isoforma NM_080916.1 do gene *DGUOK*, com 7 exões, uma vez que tem sido tida em conta na maioria dos estudos pesquisados (Poulton *et al.*, 2009). As duas isoformas encontram-se *in frame*.

2. Objectivos

O objectivo deste estudo consistiu em analisar a sequência do gene *DGUOK* num conjunto de amostras, de um grupo de doentes, em idade pediátrica, com MDS, provenientes da Unidade de Doenças Metabólicas no Hospital Pediátrico – Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E. e do Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte, E.P.E.

O gene *DGUOK* foi sequenciado e as sequências de DNA obtidas analisadas no sentido de procurar variações de sequência. As alterações encontradas foram alvo de estudos bioinformáticos para previsão do seu impacto (benigno ou patogénico) na estrutura e/ou função da proteína desoxi-guanosina cinase. A frequência de alterações foi estimada e a correlação entre o fenótipo apresentado e o genótipo estabelecida.

O presente trabalho representou um contributo significativo para a implementação do diagnóstico genético das citopatias mitocondriais associadas ao gene *DGUOK*, no laboratório de acolhimento – Laboratório de Bioquímica Genética (LBG), Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), localizado no Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC).

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

A amostragem deste estudo (Tabela II) inclui 17 doentes (8 do sexo masculino e 9 do sexo feminino), com confirmação ou suspeita clínica de MDS (Tabela 1), com proveniência da Unidade de Doenças Metabólicas no Hospital Pediátrico - Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E. (16 doentes) e do Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte, E.P.E (1 doente); e sete familiares, sendo dois deles pais da doente 3 e os restantes quatro os pais e dois irmãos do doente 4. Foram utilizadas amostras de indivíduos voluntários saudáveis para controlo em alguns procedimentos. Todas as amostras foram enviadas com consentimento informado, tendo sido também consideradas outras questões éticas, sociais e legais, como a protecção da privacidade dos doentes intervenientes e a confidencialidade dos respectivos dados.

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de vários tecidos: fibroblastos, fígado, músculo e sangue. As amostras de tecido foram obtidas no decorrer de intervenção cirúrgica (biópsia ou transplantação hepática) e em necrópsia. As amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa e colocadas num frasco com EDTA.

A extracção de DNA total foi previamente efectuada no laboratório de acolhimento – LBG, por métodos padronizados (Grazina, 2004), e as amostras foram mantidas em tampão tris-EDTA (TE).

O rastreio para detecção de depleção do mtDNA foi também previamente efectuada, por quantificação do número de cópias de mtDNA, através da técnica *real-time* PCR, no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando SYBR® *green* (Bio-Rad, Foster City, CA, USA) e *primers* específicos (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para os genes nucleares e mitocondriais (Bai & Wong, 2005). A intensidade do sinal obtido por fluorescência foi analisada com o 7500 software v.2.0.4 (Applied

Biosystems). O conteúdo relativo de DNA foi calculado pela variação do ΔCt (*cycle threshold*) (ΔCt representa a diferença entre os valores de Ct dos genes do nDNA e do mtDNA). A depleção é considerada quando o número de cópias de mtDNA é inferior a 30% do valor médio de referência no tecido mais afectado (Rahman & Poulton, 2009). Os doentes seleccionados para este trabalho foram aqueles em que a suspeita de MDS foi confirmada por evidencia molecular de depleção do mtDNA em algum dos tecidos analisados, à excepção dos doentes 11, 14, 16 e 17 que, apresentam número de cópias dentro dos limites estabelecidos como normais, mas existem indícios clínicos de que tal possa ter ocorrido depleção noutra(s) tecido(s).

No decorrer deste estudo foram usadas alíquotas de amostra diluídas, para manter a integridade, e reduzir o risco de contaminação, do *stock*. Todos os materiais (pontas para pipetas e tubos) e soluções utilizadas eram estéreis.

Tabela II. Dados clínicos dos doentes estudados.

Doente	Idade na colheita da amostra (meses)	Alterações clínicas	Cópias de mtDNA. % em relação ao controlo (tecido)
1	6	Cirrose com hiperlactacidémia, insuficiência hepática	10,8% (fígado) 63,8% (músculo)
2 [†]	4,8	Insuficiência hepática, colestase, hiperlactacidémia, <i>nistagmus</i> , hipoglicémia	3,6% (fígado) 39,9% (músculo)
3	2,3	Insuficiência hepática, colestase, <i>nistagmus</i>	8,6% (fígado) 25,9% (sangue) 60,9% (músculo)
4 ^T	3	Insuficiência hepática, <i>nistagmus</i> , colestase, história familiar positiva	25,7% (sangue) 10,1% (fígado)
5	16,8	Insuficiência hepática, hiperlactacidémia, atraso no crescimento	17,2% (sangue)
6 [†]	0,12	Hemorragia cerebral, Acidose láctica e insuficiência renal neonatais, sépsis	26,9% (músculo)
7 [†]	2,2	Insuficiência hepática, colestase	28,2% (fígado) 104,2% (músculo)
8	70,8	Alterações oculares, hiperlactacidémia, lactato/piruvato elevado	5,6% (músculo)
9	122,4	Miopia, <i>nistagmus</i> , encefalopatia, astigmatismo, dificuldades de aprendizagem, epilepsia	0,1% (sangue) 0,2% (músculo)
10	114	Mialgias, miocardiopatia, <i>nistagmus</i> , retinopatia pigmentar	4,6% (sangue) 3,6% (fígado) 14,7% (músculo)
11	57,6	Encefalopatia epiléptica, microcefalia adquirida, défice visual com <i>nistagmus</i> , distonia, dificuldades de aprendizagem, hipotonia, atraso de desenvolvimento, convulsões	79,1% (sangue)
12 ^{T†}	3	Insuficiência hepática, colestase, hipoglicémia, encefalomiopatia, hemorragia gástrica	14,2% (fígado)
13 ^{†*}	1	Miocardiopatia hipertrófica congénita, hipertensão pulmonar, insuficiência respiratória, acidose láctica	3,7% (fígado) 8,2% (músculo)
14	7	Cirrose micronodular, hiperamoniémia, Frutosemia	33,1% (fígado) 166,2% (músculo)
15 [†]	29	Insuficiência hepática aguda, miocardiopatia hipertrófica	21,0% (fígado) 186,6% (músculo)
16 ^{†*}	0,04	Hipoglicémia, falência multiorgânica	208,3% (fígado) 142,2% (músculo)
17 ^{†*}	1,2	Miocardiopatia dilatada, arritmia, paralisia	142,2% (músculo) 101,4% (fígado)

Legenda: † – Falecido; T- Doente sujeito a transplante hepático; F – Feminino; M – Masculino; * - Foi identificada depleção em miocárdio num estudo decorrido no LBG, mas estes resultados são preliminares devido ao facto de ainda não existir controlos de referência estabelecidos para o tecido em causa.

Nota: O sexo dos doentes foi omitido para garantir maior confidencialidade.

3.2. Métodos

3.2.1. Quantificação de DNA

A quantificação de DNA das amostras, previamente extraídas e diluídas, foi efectuada através do método espectrofotométrico, com o equipamento *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) e interpretada no *software NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer v.3.7* (Thermo Scientific). Este método é simples e permite a determinar a intensidade da luz ultravioleta (UV) absorvida pelas moléculas de DNA. A leitura de densidade óptica determina a quantidade de DNA, a 260 nm, e a existência de substâncias contaminantes (maioritariamente proteínas), a 280 nm. Para se prosseguir no estudo a amostra de DNA deve apresentar um grau de pureza adequado, ou seja, a razão das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm deve estar situada entre 1,8 e 2,0. Os quocientes de pureza fora desta gama de valores podem ser indicativas da presença de proteínas, fenol ou outros compostos contaminantes que absorvam perto dos 280 nm (Desjardins & Conklin, 2010).

3.2.2. Reacção da polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Figura 8), descrita por Kary Mullis, na década de 80, consiste numa reacção em que há amplificação de fragmentos específicos de DNA, permitindo a obtenção de múltiplas cópias de DNA a partir de uma única cadeia (Mullis *et al.*, 1986). A origem da PCR tem como base o princípio da replicação do DNA realizada, *in vivo*, pela DNA polimerase. Esta técnica veio revolucionar a Biologia e a Genética Molecular, tornando possível uma aplicação mais abrangente das ciências básicas e aplicadas, de tal forma que, actualmente, é imprescindível para a realização estudos nesta área.

Para realizar uma reacção de PCR é indispensável a presença de alguns factores: uma sequência molde que contenha o segmento de DNA a amplificar; uma DNA polimerase, que é usualmente a Taq polimerase¹; *primers*, complementares à cadeia de DNA, que se ligam e delimitam a zona a amplificar, sendo constituídos por sequências de oligonucleótidos, com um número de bases pequeno e variável (cerca de 20 bases); dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), que são nucleótidos livres que a DNA polimerase vai adicionar ao *primer* para formação da nova cadeia de DNA; solução tampão, que mantém o pH do meio adequado ao funcionamento da enzima (pH=8). Pode ainda ser necessária a adição de outros reagentes que, em alguns casos, não estão incluídos na solução tampão ou que são necessários em maior concentração do que aquela à qual se encontram no tampão. É o caso de cloreto de magnésio (MgCl₂) ou dimetilsulfóxido (DMSO), que aumentam a especificidade da reacção. O Mg²⁺ aumenta significativamente a estabilidade da enzima e da cadeia de DNA. O DMSO, por sua vez, aumenta capacidade de ligação dos *primers* à cadeia molde de DNA. Após a junção de todos estes componentes a reacção ocorre, num termociclador, através da execução de um programa de ciclos de temperaturas adequado. A PCR consiste em séries de cerca de 20 a 35 ciclos, sendo cada ciclo constituído por 3 fases que se realizam a temperaturas diferentes: desnaturação, *annealing* e extensão (Figura 8).

¹ Enzima extraída de organismos termófilos (*Thermus aquaticus*), resistente a temperaturas elevadas.

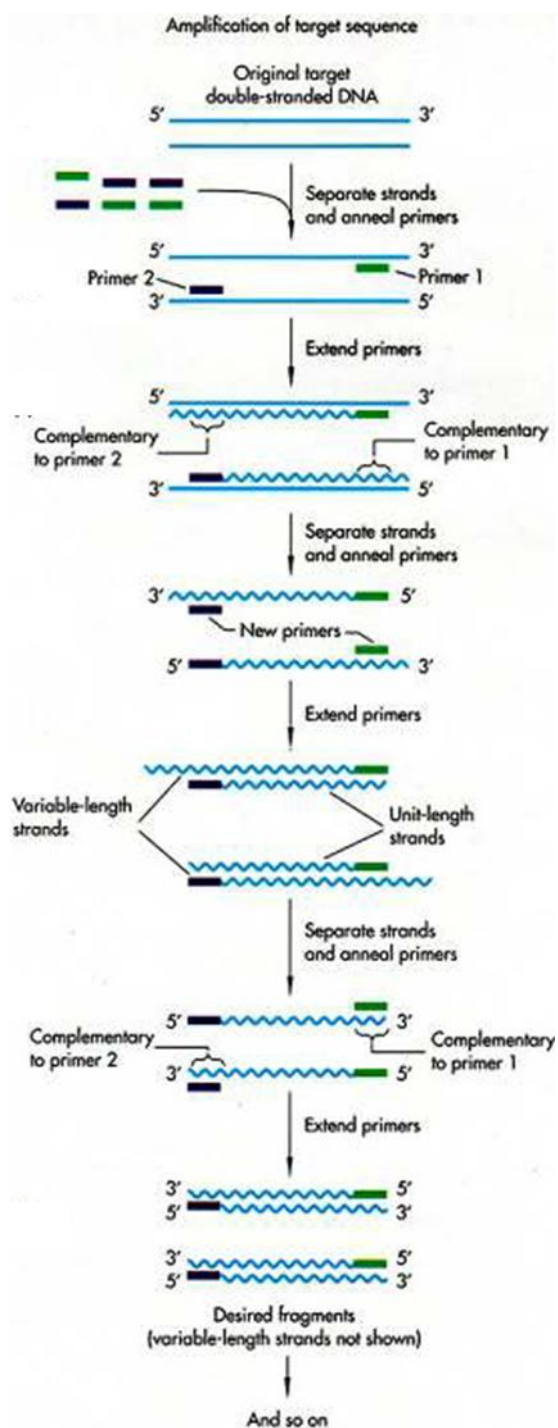


Figura 8. PCR. A PCR é a reacção que permite a amplificação de grandes quantidades de DNA a partir de uma única molécula, na presença de determinados factores, através da aplicação de temperaturas específicas que permitem desnaturação, *annealing* e extensão sucessivas. Esta reacção é efectuada em equipamentos apropriados, os termocicladores (adaptado de Griffiths *et al.*, 2005).

A desnaturação é a fase em que a dupla hélice da cadeia de DNA se separa de modo a ficar sob a forma de cadeias simples. A temperatura alta a que ocorre, cerca de 95 °C, permite a clivagem das pontes de hidrogénio que unem as bases das duas cadeias complementares. O *annealing* representa a fase em que vai haver reconhecimento e ligação dos *primers* às sequências complementares de DNA. Nesta fase, a temperatura é muito importante para a actuação correcta dos *primers*. A temperatura poderá então ser calculada especificamente para o *primer* que estiver a ser utilizado. A temperatura desta fase situa-se entre 50 a 65 °C. Para calcular a temperatura de *melting* pode ser utilizada uma fórmula matemática simples: $T_m = 2 (A+T) + 4 (C+G)$. A temperatura utilizada está relacionada com a quantidade de citosinas e guaninas que compõem o *primer*. A adenina e a timina ligam-se apenas por 2 pontes de hidrogénio enquanto a citosina e a guanina se ligam por 3 pontes de hidrogénio, sendo esta uma ligação mais forte, ou seja, uma ligação que apresenta maior dificuldade para ser quebrada, sendo a temperatura requerida mais elevada quando estes nucleótidos se apresentam em maior percentagem.

Na extensão, vai haver adição dos dNTPs ao *primer* para sintetizar a nova cadeia de DNA, a cadeia complementar à cadeia molde. Este processo é catalizado pela actuação da DNA polimerase, enzima que tem a capacidade de adicionar dNTPs no sentido 5' → 3'.

Depois de cada um dos ciclos da PCR vai haver duplicação da quantidade de DNA, e assim, após 'n' ciclos teremos 2ⁿ cópias de DNA.

Apesar de ser uma técnica que apresenta uma elevada taxa de sucesso, a PCR é também uma técnica muito sensível, sendo necessária precaução na sua execução de modo a contornar factores que possam afectar a sua eficiência e especificidade (Metzenberg, 2007; Viljoen *et al.*, 2005; Regateiro, 2003).

Os *primers* utilizados para amplificar os fragmentos do gene *DGUOK* foram previamente desenhados no LBG com auxílio do *software Primer3*[®] (Tabela III)

(Rozen & Skaletsky, 2000). Existem vários pontos importantes que devem ser tidos em conta ao desenhar *primers*, para além dos referidos no ponto anterior. A T_m dos *primers* (*Forward* e *Reverse*) para um fragmento deve ser semelhante. Os *primers* não devem emparelhar entre si, nem consigo próprios, não devendo igualmente formar estruturas secundárias.

Tabela III. Caracterização dos *primers* utilizados para amplificar o gene *DGUOK*.

Exão	Posição nucleotídica <i>Primer Forward</i>	T_m <i>Primer Forward</i>	Posição nucleotídica <i>Primer Reverse</i>	T_m <i>Primer Reverse</i>	Tamanho do fragmento amplificado (bp)
1	74153728	59.7	74154347	59.8	620
2	7465777	60.1	74166383	59.9	607
3	74173606	60.5	74174234	59.9	629
4	74177457	60.4	74178112	59.9	656
5	74184004	59.9	74184539	59.0	536
6	74184980	60.1	74185607	61.0	628
7	74185576	58.9	74186127	58.9	552

Legenda: bp- pares de bases (*base pairs*); T_m - Temperatura de *melting*

As amostras utilizadas para amplificação dos fragmentos foram, preferencialmente, provenientes de sangue, uma vez que se trata da amplificação de um gene nuclear. Para amplificação dos fragmentos do gene *DGUOK* foi feita uma mistura de PCR contendo: dNTPs (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden) os *primers* (*forward* e *reverse*) (Invitrogen Life Technologies), solução tampão, $MgCl_2$ e enzima Taq polimerase (Fermentas) e DNA, nas concentrações e quantidades adequadas. Esta mistura foi colocada num termociclador de acordo com programas de temperaturas adequados a cada fragmento.

Para cada reacção de PCR foi amplificada uma amostra controlo (sem doença), e para controlo negativo foi feita a reacção da mesma forma, mas substituindo o DNA por água, para avaliar a possibilidade de contaminação.

3.2.3. Electroforese em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose² permite a separação e identificação de moléculas de DNA. Esta técnica consiste na aplicação de um campo eléctrico que vai fazer com que os iões e moléculas carregados negativamente se desloquem para o ânodo, enquanto os compostos carregados positivamente migram para o cátodo. Assim, a utilização da electroforese é eficaz na determinação do sucesso da reacção de PCR, uma vez que o DNA possui a capacidade de migrar quando aplicado um campo eléctrico, dado que é um composto que possui carga negativa. A velocidade de migração das moléculas de DNA no gel pode ser influenciada por vários condicionantes, nomeadamente: a voltagem, o tempo, a temperatura, o pH, o peso molecular e a percentagem de agarose do gel. A preparação de um gel de agarose inclui a adição de um composto de marcação de moléculas de DNA que permita a visualização dos fragmentos quando sujeitos a radiação ultravioleta (UV) (Stellwagen, 2009; Metzzenberg, 2007), frequentemente o brometo de etídio.

Os fragmentos do gene *DGUOK* possuem um tamanho de aproximadamente 600 pb sendo adequado a utilização de um gel com 1% de *SeaKem*[®] LE Agarose (Lonza Rockland, ME, USA) (Stellwagen, 2009). Na preparação do gel foi utilizada a solução tampão Tris/Borato - EDTA (TBE) 1x, preparado a partir de da solução de concentrada de TBE³ (10x) e brometo de etídio 1 mg/ml. Este marcador de ácidos nucleicos é muito eficiente uma vez que se

² Polissacarídeo de cadeia longa extraído de uma alga. A agarose é dos compostos mais utilizados na preparação de géis.

³ Composição: Tris-base 90mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2,5 mM. pH: 8,1-8,4.

intercala com as bases da dupla hélice do DNA, formando um complexo, que quando irradiado com luz UV (260-360 nm) emite fluorescência, permitindo a sua visualização. A capacidade do brometo de etídio se intercalar com o DNA faz dele um composto mutagénico; como tal, a sua manipulação requer cuidados específicos.

Na análise dos fragmentos do gene *DGUOK*, a electroforese decorreu em equipamento apropriado, a uma voltagem e tempo adequados, utilizando 2 µL de produto de PCR e 2 µL de *Loading Buffer* (LB). Tendo em consideração que o DNA linear de dupla cadeia atravessa a matriz a uma taxa inversamente proporcional ao logaritmo do seu peso molecular, foi ainda utilizado o marcador de peso molecular *pUC Mix Marker 8* (Fermentas), para comparação do peso molecular dos fragmentos de interesse, de forma a confirmar se eram os pretendidos.

Após a electroforese, os géis foram observados no equipamento *ChemiDOC™ XRS* (Bio-Rad), com recurso ao *software Quantity One 4.6.9* (Bio-Rad), e os resultados registados em fotografia.

3.2.4. Purificação de produtos da PCR de amplificação

Após a amplificação, é necessário remover os restos de componentes da reacção, como *primers*, dNTPs, etc. Foi utilizada *ExoSAP-IT®* (USB® Corporation, Cleveland, Ohio, USA) para purificação dos produtos da PCR. Este composto é constituído por duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a *Shrimp Alkaline Phosphatase* e uma solução tampão específica. A *ExoSAP-IT®* foi adicionada aos produtos de PCR, após a reacção, sendo inactivada após o tratamento, através da exposição a uma temperatura elevada, no termociclador.

Esta etapa tem elevada importância por permitir a eliminação de componentes que poderiam interferir nas reacções que se seguem, caso se acumulassem (Grazina, 2004).

3.2.5. PCR de sequenciação

A PCR de sequenciação é a fase em que há adição de uma mistura de reacção, ao produto purificado, com o objectivo de sequenciar posteriormente os fragmentos de DNA.

Na sequenciação pelo método de Sanger, a DNA polimerase cataliza a extensão do *primer*, por adição dos diferentes dNTPs pela ordem determinada pela cadeia de DNA modelo e vão-se estabelecendo ligações fosfodiéster entre eles. Em cada solução de reacção para além dos dNTPs, existem também di-desoxiribonucleótido Tri-fosfato (ddNTPs) marcados com fluorocromos (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP). Quando um ddNTP é adicionado, deixa de ser possível estabelecer uma ligação fosfodiéster com um dNTP subsequente, terminando aí a extensão. São originados fragmentos de DNA com diferentes comprimentos (Regateiro, 2003; Grazina, 2004; Metzenberg, 2007).

Para proceder à reacção de sequenciação dos fragmentos do gene *DGUOK* foram utilizados, para além do produto de PCR, um *primer* (Invitrogen) e *Big Dye*[®] *Terminator 3.1 Sequencing Standard Kit* (Applied Biosystems). Este contém dNTPs, ddNTPs marcados com os quatro fluorocromos diferentes, tampão e DNA polimerase.

3.2.6. Purificação dos produtos da PCR de sequenciação

A purificação efectuada após a PCR de sequenciação tem como objectivo a remoção de terminadores contidos no produto de PCR.

No presente trabalho a purificação foi feita por precipitação com etanol e os sedimentos foram dissolvidos em *Hi-Di*[™] *Formamide* (Applied Biosystems) (Grazina, 2004).

3.2.7. Sequenciação automática de DNA

A sequenciação automática de DNA permite determinar a ordem dos nucleótidos num determinado fragmento de DNA através de um equipamento, o sequenciador automático.

A electroforese capilar permite a distinção do tamanho dos fragmentos, sendo possível determinar a sequência de nucleótidos do fragmento em análise, por leitura de comprimento de onda que o fluorocromo ligado a cada ddNTP apresenta. Esta leitura ocorre através de um laser que, ao incidir sobre o capilar vai provocar a excitação dos fluorocromos e, conseqüentemente, a emissão de fluorescência para leitura do comprimento de onda de emissão de determinado fluorocromo, sendo assim identificados os nucleótidos.

Este método baseia-se na capacidade da DNA polimerase incorporar ddNTPs, na terminação da replicação por parte dos ddNTPs e na eficiência da electroforese que separa fragmentos de DNA, cujo tamanho difere em apenas uma base (Regateiro, 2003; Grazina, 2004; Metzenberg, 2007).

Os produtos da PCR de sequenciação relativos aos fragmentos do gene *DGUOK* foram sequenciados no sequenciador automático *ABI Prism® 3130* (Applied Biosystems).

3.2.8. Análise de restrição enzimática

A restrição enzimática RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é a uma técnica que permite a detecção de variações de sequência, nomeadamente para confirmação de alterações encontradas por outro método como a sequenciação automática.

No presente trabalho, a análise de restrição enzimática por PCR-RFLP foi usada para confirmar alterações detectadas na análise de sequenciação

automática, de acordo com a descrição da tabela IV, seguindo as instruções do fabricante.

Tabela IV. Enzimas utilizadas para confirmação das alterações detectadas.

Variação de sequência	Exão	Enzima	Sequência de restrição
c.353G>A	3	<i>Acil</i> (Fermentas)	5'...C [▼] CGC...3' 3'...GGC [▲] G...5'
c.749T>C	6	<i>Hpy188I</i> (Fermentas)	5'...TCN [▼] GA...3' 3'...AG [▲] NCT...5'
c.677A>G	5	<i>Bsh123I (BstUI)</i> (Fermentas)	5'...CG [▼] CG...3' 3'...GC [▲] GC...5'

Os resultados por esta abordagem permitem identificar os três genótipos possíveis para as alterações em causa.

3.2.9. Análise de sequências e estudos *in silico*

Os dados obtidos após sequenciação automática foram analisados no software *SeqScape*[®] v.2.5 (Applied Biosystems), com o objectivo de pesquisar variações de sequência apresentadas. A sequência de referência do gene *DGUOK*, foi obtida na base de dados NCBI (Anexo I).

O estudo de variações de sequência encontradas na zona codificante foi feito através do software *PolyPhen-2*[®] (Adzhubei *et al.*, 2010).

O estudo de *splicing* foi efectuado para as alterações encontradas na região não codificante, que se situassem até 50 nucleótidos antes ou depois do início/fim do exão, com recurso ao software *NNSPLICE v. 0.9*[®] (Reese *et al.*, 1997).

4. Resultados

4.1. Amplificação dos fragmentos do gene *DGUOK* por PCR

Os fragmentos de DNA do gene *DGUOK* foram amplificados, com sucesso, através da técnica de PCR, de acordo com a descrição feita no Capítulo 2. O resultado das reacções foi confirmado por electroforese em gel de agarose (Figura 9), antes de prosseguir para a purificação com *ExoSAP-IT*[®].

Os controlos utilizados permitiram controlar algumas variáveis, nomeadamente a concentração a usar, as condições de PCR e possíveis contaminações. Não houve amplificação de DNA no controlo negativo em todas as reacções, o que confirmou a ausência de contaminações.

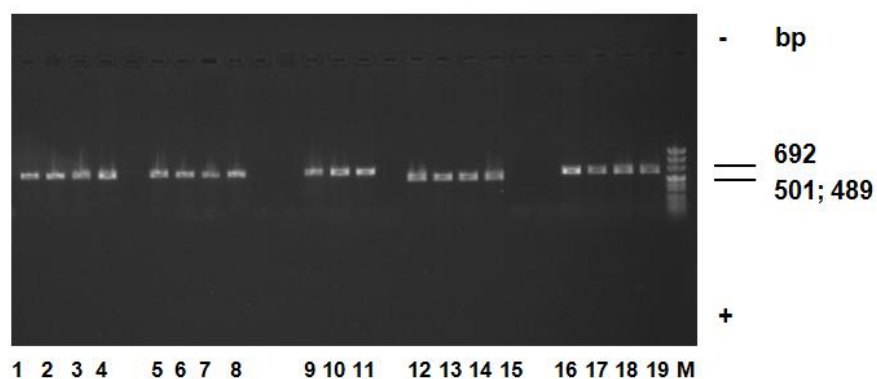


Figura 9. Electroforese em gel com 1% de agarose evidenciando fragmentos do gene *DGUOK* amplificados. Na fotografia é possível observar as bandas correspondentes à amplificação de algumas amostras para alguns exões do gene *DGUOK* (exões 2 (1-4), 3 (5-8), 4 (9-11), 5 (12-15) e 6 (16-19)) e o marcador de peso molecular utilizado, *pUC Mix Marker 8, ready-to-use* para confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados.

Os resultados revelaram um total de 11 variações de sequência diferentes, algumas delas em mais que um doente. Todas das alterações encontradas correspondem a substituição de uma base e foi feita a confirmação bidireccional. Foram identificadas 5 alterações na região codificante, tendo-se verificado que 1 é silenciosa e 4 são *missense*, ou seja, levam a alteração do aminoácido formado. Na região intrónica, foram identificadas 4 alterações, 3 das quais correspondiam a SNPs já descritos. Foi ainda identificada uma alteração na no promotor e outra na região 3'UTR, estando também ambas já descritas como SNP. Estes dados foram obtidos por consulta das bases de dados disponíveis, nomeadamente NCBI.

A variação de sequência c.159G>A, detectada no exão 2, na amostra 17 não leva à alteração do aminoácido, visto que esta mudança de nucleótido continua a codificar treonina, de acordo com o código genético. Esta alteração foi detectada em heterozigotia e corresponde a um SNP já descrito – rs62641680.

Foi identificada uma alteração no intrão 2- IVS3-190A>C, uma no intrão 3 - IVS3+112A>G, e duas no intrão 4 - IVS3-62C>A e IVS4+221T>C. A alteração intrónica IVS3+112A>G foi identificada nos doentes 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 e 17, homozigótica em 5 casos e heterozigótica em 8. A variação IVS3-62C>A foi identificada apenas no doente 5 em homozigotia. A alteração IVS4+221T>C foi identificada nos doentes 6, 7, 8, 9, em heterozigotia. No intrão 2, foi detectada a alteração IVS3-190A>C, no doente 14, em heterozigotia. À excepção da alteração IVS3-62C>A, todas as restantes correspondem a SNPs já descritos em bases de dados.

Na amostra 6 foi identificada a alteração heterozigótica c.-133T>C, localizada no promotor do gene, em heterozigotia.

Na região 3'UTR das amostras 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13,14, 15, 16 e 17 foi identificada a variação c.*13A>T, em homozigotia em quatro doentes e em heterozigotia em oito.

Tabela V. Alterações encontradas no gene *DGUOK*.

Doente	Localização da alteração no gene <i>DGUOK</i>	Alteração encontrada ⁴	Homozigotia/ Heterozigotia	Posição e aminoácido alterado	Identificação do SNP
1	Exão 3	c.353G>A	Htz	p.R118H Arginina>Histidina	-
	Exão 6	c.749T>C	Htz	p.L250S Leucina>Serina	-
	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	rs4777
2	Exão 5	c.677A>G	Hmz	p.H226R Histidina>Arginina	-
3	Exão 5	c.677A>G	Hmz	p.H226R Histidina>Arginina	-
4	Intrão 3	IVS3+112A>G	Hmz	-	rs940297
	Exão 6	c.749T>C	Hmz	p.L250S Leucina>Serina	-
5	Intrão 3	IVS3+112A>G	Hmz	-	rs940297
	Intrão 4	IVS3-62C>A	Hmz	-	-
6	3'UTR	c.*13A>T	Hmz	-	rs4777
	Promotor	c.-133T>C	Htz	-	rs831526
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Htz	-	rs940297
	Intrão 4	IVS4+221T>C	Htz	-	rs7564379
7	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	rs4777
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Htz	-	rs940297
	Intrão 4	IVS4+221T>C	Htz	-	rs7564379
8	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	rs4777
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Htz	-	rs940297
	Intrão 4	IVS4+221T>C	Htz	-	rs7564379
9	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	rs4777
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Htz	-	rs940297
	Intrão 4	IVS4+221T>C	Htz	-	rs7564379
10	3'UTR	c.*13A>T	Hmz	-	rs4777
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Hmz	p.Q170R Glutamina>Arginina	rs74874677
11	3'UTR	c.*13A>T	Hmz	-	rs4777
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Htz	-	rs940297
12	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	rs940297
	Exão 6	c.749T>C	Htz	p.L250S Leucina>Serina	-
13	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	rs4777
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Htz	-	rs940297
14	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	Rs1523828
	Intrão 2	IVS3-190A>C	Htz	-	rs4777
15	3'UTR	c.*13A>T	Htz	-	rs940297
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Htz	-	rs4777
16	3'UTR	c.*13A>T	Hmz	-	rs940297
	Intrão 3	IVS3+112A>G	Hmz	-	rs4777
17	Exão 2	c.159G>A	Htz	Não altera aminoácido	rs62641680
	3'UTR	c.*13A>T	Hmz	-	rs940297

Legenda: Hmz- homozigotia; Htz - heterozigotia

⁴ A nomenclatura da alterações foi atribuída com base em Dunnen & Antonarakis, 2001.

A alteração c.353G>A foi identificada, em heterozigotia, no exão 3 da doente 1 (Figura 11). Esta variação de sequência implica a substituição de um nucleótido de guanina por um nucleótido de adenina, levando à substituição de arginina por histidina no aminoácido 118 (p.R118H).

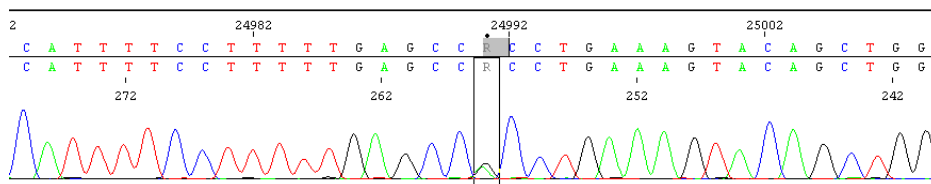


Figura 11. Electroferograma evidenciando a alteração c.353G>A. Esta alteração foi detectada em heterozigotia na doente 1. Esquema de cores da leitura dos nucleótidos: A- verde; T – vermelho; C – azul; G – preto.

A alteração detectada com maior frequência na zona codificante foi c.749T>C, localizada no exão 6 (Figura 12). Esta implica alteração do aminoácido 250, por substituição de leucina por serina (p.L250S). Esta mutação foi identificada nos doentes 1, 4 e 12. No entanto, apenas o doente 4 a apresentava na forma homozigótica. O estudo da alteração na família do doente 4 revelou a forma como foi herdada esta alteração (Figura 12). As sequências de DNA obtidas com as amostras dos familiares do doente 4 mostrou que: ambos os pais são heterozigóticos para a alteração, sendo portadores, o irmão saudável é homozigótico normal e o irmão doente, e já falecido devido à doença, é homozigótico para a alteração, tal como o doente probando em estudo.

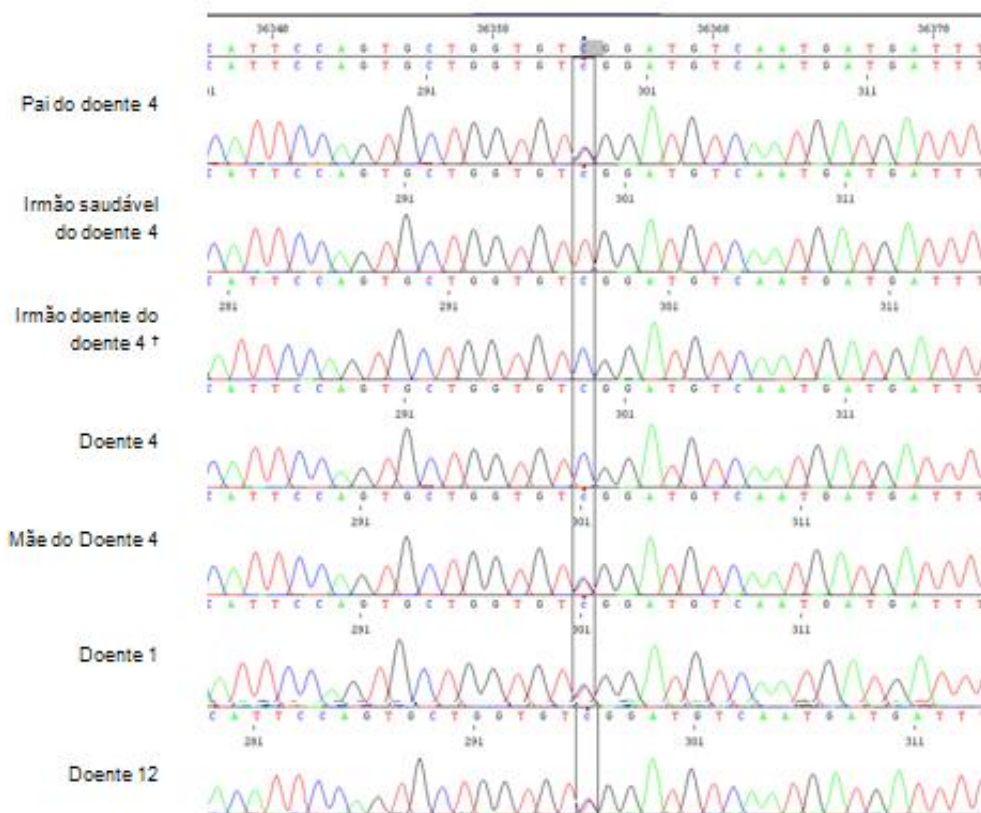


Figura 12. Electroferogramas evidenciando a alteração c.749T>C. Esta alteração foi detectada em homozigotia nos doentes 1, 4 e 12 (CC). O estudo familiar da alteração, nos pais do doente 4, mostrou que ambos são heterozigóticos (CT) para a alteração. Este doente possuía ainda dois irmãos, mais velhos, verificando-se a homozigotia normal (TT) do mais velho e o mesmo padrão genético herdado pelo irmão já falecido (CC). Esquema de cores da leitura dos nucleótidos: A- verde; T – vermelho; C – azul; G – preto.

No exão 5 das amostras 2 e 3 foi identificada, na forma homozigótica, a variação de sequência c.677A>G (Figura 13). Esta variação relativamente à sequência referência envolve substituição do aminoácido histidina por arginina na posição 226 (p.H226R). Esta alteração é decorrente da alteração de adenina por guanina ao nível do tripleto que lhe dá origem. O estudo familiar do doente 3 foi efectuado, tendo-se verificado a heterozigotia dos pais para a alteração em estudo (Figura 13)

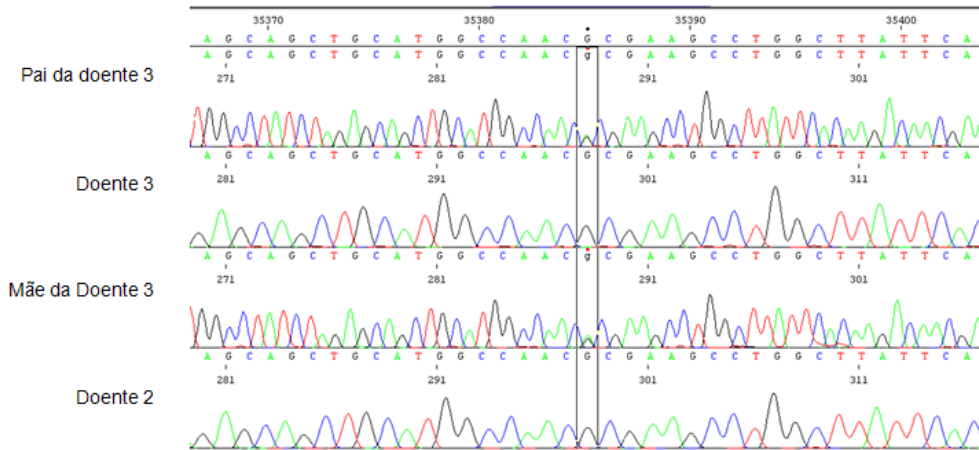


Figura 13. Electroferogramas evidenciando a alteração c.677A>G. Esta alteração foi detectada em homozigotia nas amostras correspondentes aos doentes 2 e 3 (GG). O estudo familiar da alteração, nos pais da doente 3, mostrou que ambos são heterozigóticos para a alteração (AG). Esquema de cores da leitura dos nucleótidos: A- verde; T – vermelho; C – azul; G – preto.

No doente 10 foi encontrada a variação de sequência c.509A>G, correspondente a um SNP identificado com o rs 74874677 (Figura 14). A alteração em causa, leva à alteração de glutamina por arginina (p.Q170R). Genotipicamente esta alteração encontrava-se em heterozigotia.

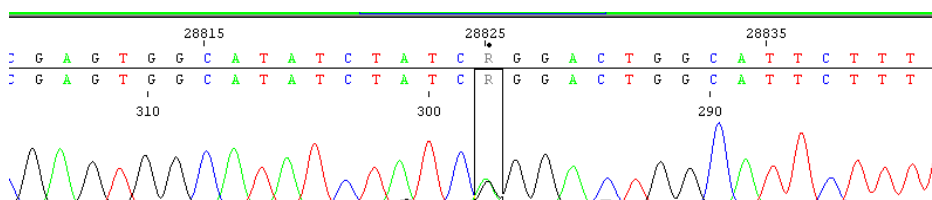
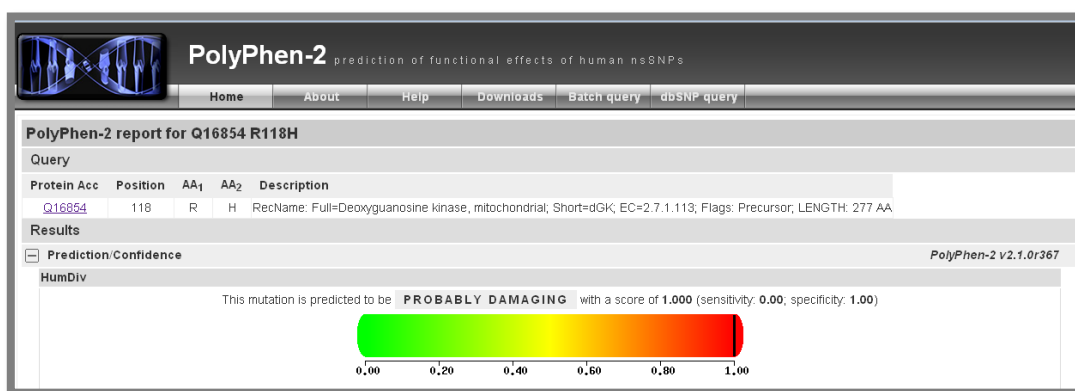


Figura 14. Electroferograma evidenciando a variação de sequência c.509A>G. Esta alteração foi detectada em heterozigótia no doente 10. Esquema de cores da leitura das bases: A- verde; T – vermelho; C – azul; G – preto.

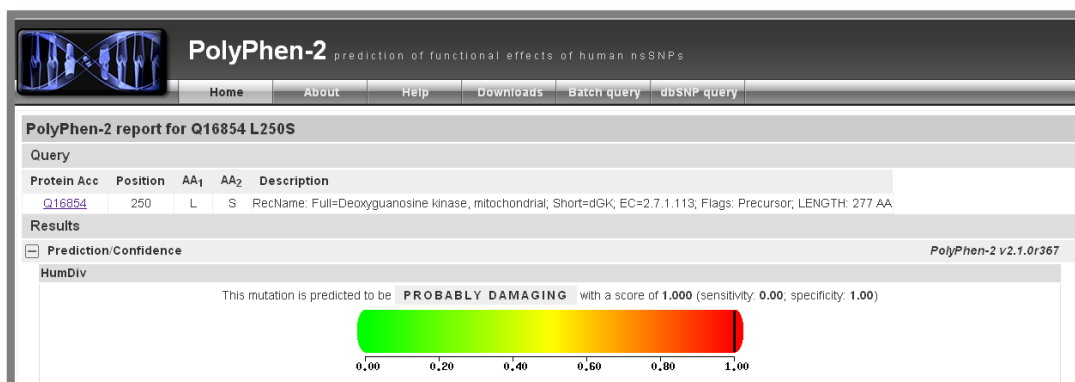
4.3. Análise *in silico* das alterações identificadas

O estudo das quatro alterações acima referidas, que causam alteração de aminoácido, foram alvo de estudo *in silico*, com recurso ao software *PolyPhen-2*[®], que revelou a previsão de nível máximo de patogenicidade para todas (Figura 15).

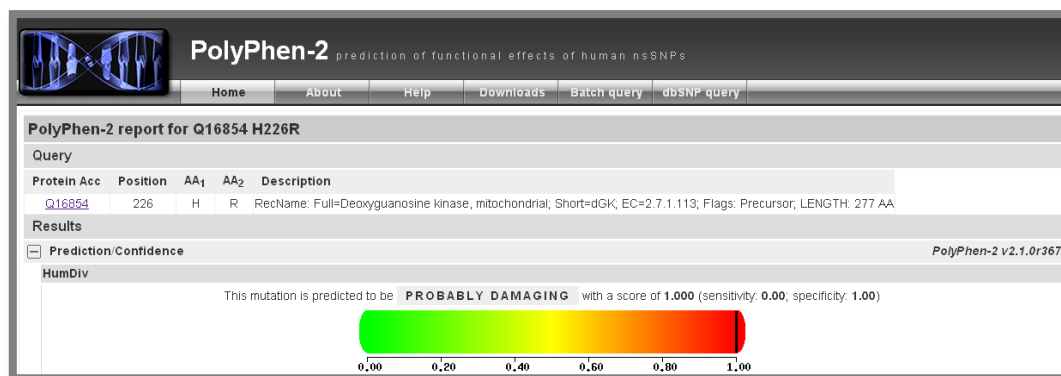
A.



B.



C.



D.

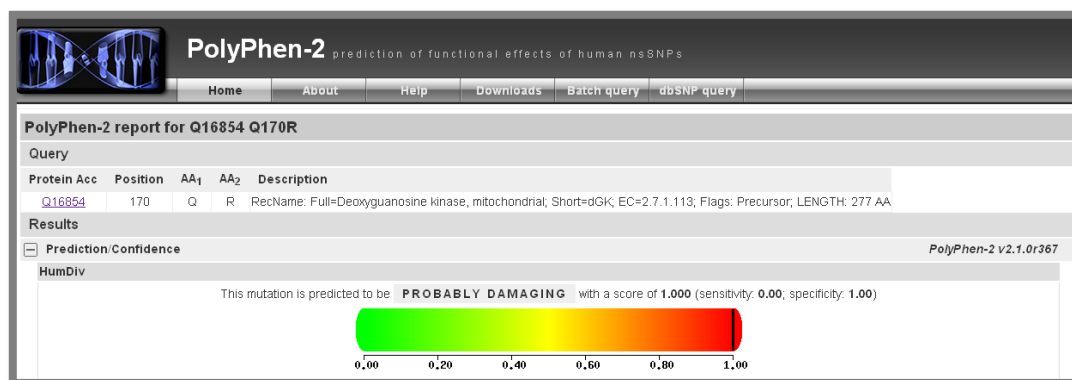


Figura 15. Resultados da análise do impacto das mutações *missense* encontradas no estudo do gene *DGUOK*: c.353G>A (A- p.R118H), c.749T>C (B- p.L250S), c.677A>G (C- p.H226R) e c.509G>A (D- p.Q170R); demonstrando a previsão do nível máximo de patogenicidade, no que diz respeito à modificação da estrutura/função normal da proteína desoxiguanosina cinase. A ferramenta utilizada foi o software *PolyPhen-2*[®].

Foi efectuado estudo de *splicing*, através do software *NNSPLICE* v. 0.9[®] para alterações que se encontrassem até um máximo de 50 bp antes ou após o exão, sendo que a única que cumpria este parâmetro era a alteração c.*13A>T. Os

resultados estão apresentados na figura 16, sendo possível verificar que é muito pouco provável que haja alteração do *splicing*, dado o *score* obtido.

a) Análise para o alelo normal:

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 193.137.208.131.3992.0 :

Start	End	Score	Exon	Intron
35	49	0.99	cccacag	gt aaacac

Acceptor site predictions for 193.137.208.131.3992.0 :

Start	End	Score	Intron	Exon
21	61	0.99	ctgattttctccttcccac	ag gtaaacacctttgtaaagaa
140	180	0.68	caaccacctttccatcccc	ag cccctctcatccctggagca

b) Análise para o alelo mutante:

Splice site predictions for 1 sequence with donor score cutoff 0.40, acceptor score cutoff 0.40 (exon/intron boundary shown in larger font):

Donor site predictions for 193.137.208.131.3951.0 :

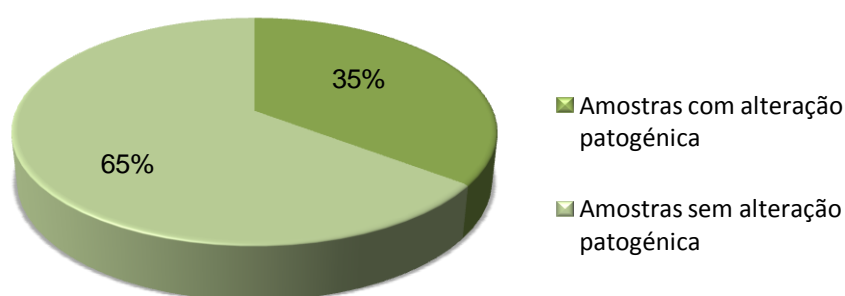
Start	End	Score	Exon	Intron
35	49	0.99	cccacag	gt aaacac

Acceptor site predictions for 193.137.208.131.3951.0 :

Start	End	Score	Intron	Exon
21	61	0.99	ctgattttctccttcccac	ag gtaaacacctttgtaaagaa
140	180	0.68	caaccacctttccatcccc	ag cccctctcatccctggagca

Figura 16. Resultado da análise *in silico* para verificação da alteração de splicing para a variação de sequência c.*13A>T. Foi utilizado o software NNSPLICE v. 0.9[®].

Em resumo, os resultados obtidos mostram que 35% das amostras estudadas têm alterações provavelmente patogênicas (Figura 17), sendo ainda que a maioria das variações de sequência encontradas heterozigóticas (Figura 18).



I
i

Figura 17. Amostras com alterações no gene *DGUOK* com previsibilidade patogênica. Em 35% das amostras foram identificadas alterações provavelmente patogênicas.

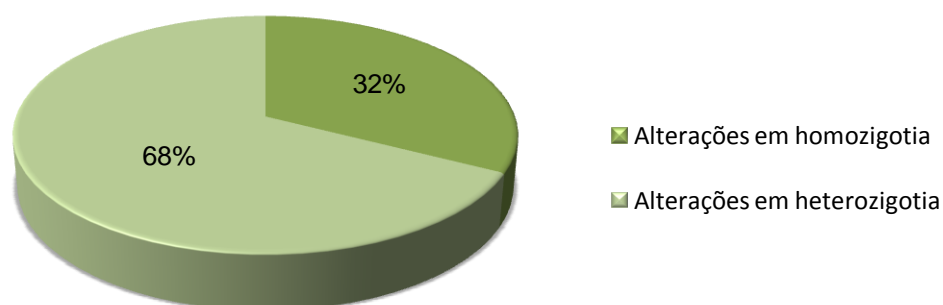


Figura 18. Proporção de alterações homozigóticas e heterozigóticas encontradas. A maioria das alterações encontradas está na forma heterozigótica (68%).

Na figura 19 apresentam-se os dois heredogramas dos casos familiares analisados, demonstrando a hereditariedade da mutação encontrada no doente.

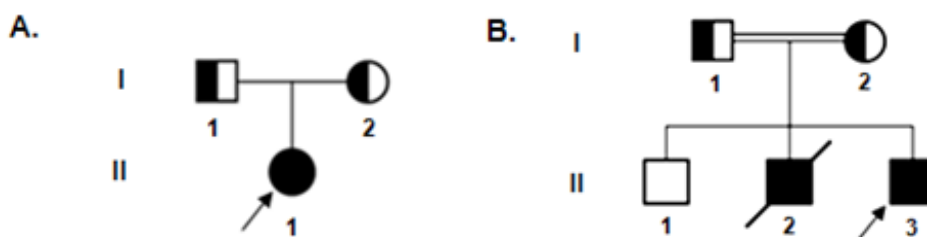


Figura 19. A - Heredograma para a alteração c.677A>G da doente 3. B - Heredograma da família do doente 4 para a alteração c.749T>C.

4.4. Análise de restrição enzimática para confirmação de variações de sequência

No sentido de confirmar por outro método três das alterações provavelmente patogênicas identificadas por sequenciação automática, recorreu-se à análise de restrição enzimática por RFLP. Os resultados da electroforese após restrição enzimática encontram-se na figura 20 (A-C).

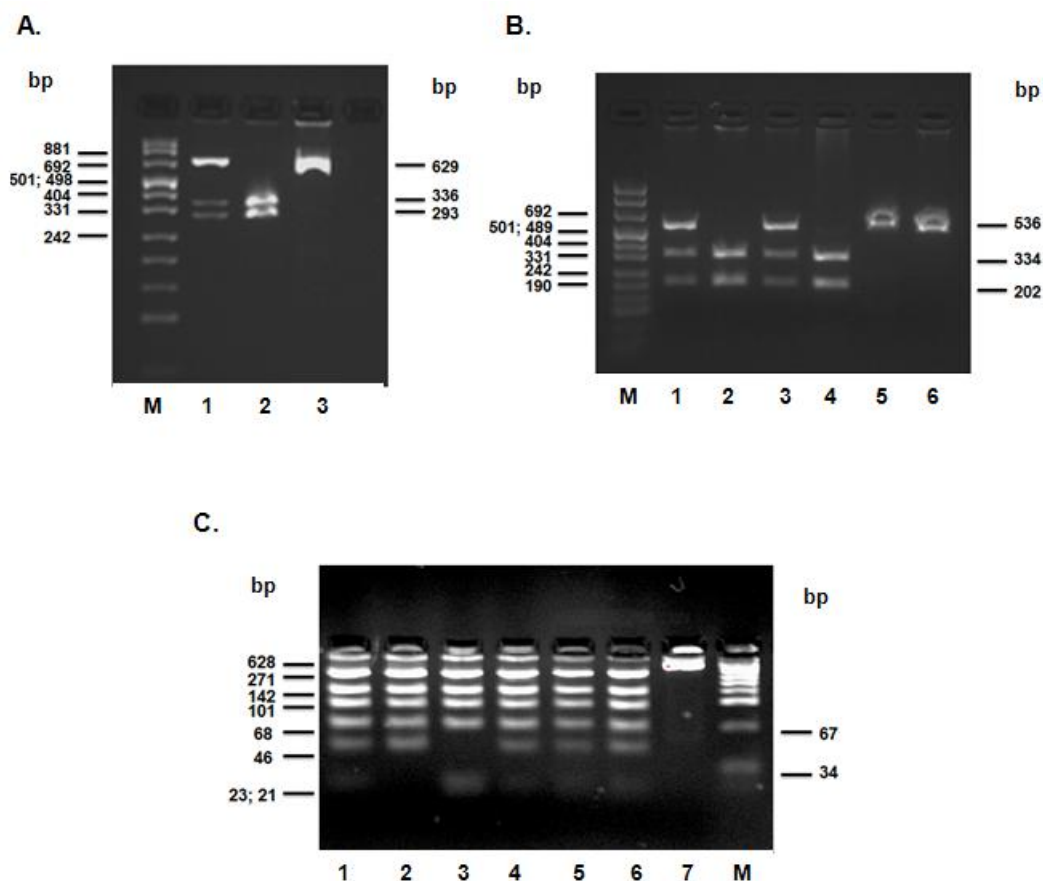


Figura 20. Resultados da análise de restrição por PCR-RFLP. Os resultados apresentam-se em fotografia (sob irradiação ultravioleta) de géis corados com brometo de etídio. A- Fotografia de gel de agarose (3,5%) mostrando os fragmentos de DNA resultantes da PCR-RFLP para confirmação da alteração heterozigótica c.353G>A detectada no doente 1. Linhas de migração do gel: M – Marcador *pUC Mix Marker 8, ready-to-use*; 1- Doente mutante (heterozigótico); 2- Amostra normal; 3- Fragmento não digerido correspondente à variante *wild type*. B - Fotografia de gel de agarose (2%) mostrando os fragmentos de DNA resultantes da PCR-RFLP para confirmação da alteração homozigótica c.677A>G detectada nos doentes 2 e 3, e na família do doente 3. Linhas de migração do gel: M – Marcador *pUC Mix Marker 8, ready-to-use*; 1- Pai da doente 3 (heterozigótico); 2- Doente 3 (homozigótica mutante); 3- Mãe do doente 3 (heterozigótica); 4- Doente 2 (homozigótico mutante); 5- Amostra normal; 6- Fragmento não digerido correspondente à variante *wild type*. B - Fotografia de gel de agarose MP (6%) mostrando os fragmentos de DNA para confirmação da alteração em c.749T>C detectada nos doentes 1, 4 e 12, e estudo familiar do doente 4. Linhas de migração do gel: 1- Pai do doente 4 (heterozigótico); 2- Irmão saudável do doente 4; 3- Doente 4 (homozigótico mutante); 4- Mãe do doente 4 (heterozigótica); 5- Doente 1 (heterozigótico); 6- Doente 12 (heterozigótico); 7- Fragmento não digerido correspondente à variante *wild type*; M – Marcador *pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23, ready-to-use*.

A fotografia apresentada na figura 20-A confirma em heterozigotia a alteração c.353G>A (doente1), tendo sido identificadas as bandas correspondentes aos fragmentos de 629, 336 e 293 bp (Figura 20.A.1.). A enzima *Acil* corta a sequência normal na região reconhecida, produzindo os fragmentos de 336 e 293 bp (normal), tendo-se verificado a heterozigotia pelo aparecimento da banda de 629 bp (mutante) como seria de esperar (Figura 20-1). O controlo normal (Figura 20.A.2.) apresenta bandas esperadas (336 bp e 293 bp), resultantes da digestão enzimática.

O resultado da electroforese apresentada na figura 20-B mostra que os doentes 2 e 3 (linhas 2 e 4 no gel) são homozigóticos mutantes, tendo em consideração que a enzima em questão reconhece a sequência mutante produzindo os fragmentos de 334 e 202 bp. Os pais do doente 3 são heterozigóticos para a alteração c.677A>G, visível pela identificação das bandas de tamanhos 560, 334 e 202 bp, resultantes dos dois cortes efectuados pela enzima (linhas 1 e 3 no gel). A amostra normal para a variação, previamente sequenciada por sequenciação automática, mostrou apenas a banda que seria de esperar - 536 pb (linha 5 no gel).

Foi possível confirmar que o doente 4 (Figura 20-C; linha 4 do gel) é homozigótico mutante para a alteração c.749T>C apresenta as bandas de 23 e 21 pb resultantes da variante mutante, sendo os pais heterozigóticos pois é possível identificar as bandas 46 e 23;21 bp (linhas 1 e 4 no gel). O mesmo se verifica para os doentes 1 e 12, que também são heterozigóticos (linhas 5 e 6 no gel). O irmão saudável do doente 4 apresenta apenas a banda de 46 pb (linha 2 no gel), que corresponde à variante normal.

5. Discussão

Os objectivos propostos no início deste trabalho foram alcançados. Foram sequenciadas 17 amostras de doentes com fenótipo de MDS, tendo-se verificado a presença de variações relativamente à sequência de referência em todas as amostras.

O trabalho efectuado permitiu identificar: cinco alterações na zona codificante do gene *DGUOK* (1 mutação silenciosa e 4 mutações *missense*); 4 alterações na zona intrónica, uma no promotor do gene e uma na região 3' UTR. Todas as alterações potencialmente patogénicas, encontradas na região codificante do gene *DGUOK*, foram verificadas por sequenciação automática de DNA no sentido oposto àquele que se tinha sequenciado inicialmente, o *primer reverse* em vez do *primer forward* aquando da PCR de sequenciação (ou *vice-versa*).

O estudo da CRM dos 17 doentes em estudo, realizado previamente no LBG de acordo com a metodologia descrita (Grazina, 2011), mostrou défice nos complexos em quase todos os doentes, como seria de esperar, exceptuando-se apenas os doentes 8 e 11. No entanto, não se pode excluir que possam apresentar défice nos complexos da CRM noutra tecido, que não o(s) estudado(s) ou que possa haver efeitos compensatórios complexos. Estes dados são importantes na correlação com a MDS, na medida em que o défice da CRM pode ser provocado por alterações no gene *DGUOK* que provoquem redução do número de cópias de mtDNA, e conseqüentemente levem à produção deficiente dos complexos (Sarzi *et al.*, 2007).

A alteração heterozigótica c.353G>A (doente 1), localizada no exão 3, provoca substituição de arginina por histidina no aminoácido 118 da proteína formada pelo gene *DGUOK* (p.R118H). De acordo com o previsto pelos resultados obtidos com o estudo *in silico* da alteração com o software *PolyPhen-2*[®], que apresentou *score* máximo (1), esta variação de sequência é potencialmente patogénica.

A variação c.677A>G, identificada em homozigotia no exão 5 das amostras 2 e 3, causa a substituição do aminoácido histidina por arginina (p.H226R). Esta mutação foi descrita pela primeira vez por Dimmock e colaboradores em 2008 (Dimmock *et al.*, 2008) no estudo do caso de uma criança de 8 meses que apresentava tubulopatia renal, hipotonia e atraso de crescimento. O resultado da análise do estudo *in silico* da alteração no software *PolyPhen-2*[®], é indicativo de probabilidade patogénica máxima, tendo apresentado *score 1*. O estudo familiar do doente 3, por sequenciação automática de DNA e PCR-RFLP, permitiu verificar a hereditariedade desta mutação, sendo os pais portadores heterozigóticos.

Os doentes 2 e 3 têm história clínica semelhantes, apresentando ambos falência hepática, colestase e *nistagmus*. Esta associação pode sugerir uma relação entre o fenótipo clínico e o genótipo apresentados, apesar da pequena amostragem não permitir uma conclusão definitiva. Tem-se conhecimento de que a doente 2 já faleceu, como consequência da sua condição.

A alteração detectada com maior frequência na região codificante foi c.749T>C, localizada no exão 6. Esta variação de sequência descrita como mutagénica pela primeira vez por Wang e colaboradores, causa alteração do aminoácido 250, por substituição de leucina por serina (p.L250S) (Wang *et al.*, 2005), relatando o caso de um doente que sofria de insuficiência hepática, tendo-se verificado também que o número de cópias de mtDNA estava drasticamente reduzido no fígado, e numa proporção menor, no músculo. A patogenicidade desta substituição indica valor máximo (1), de acordo com a análise feita no software *Polyphen-2*[®]. Esta mutação foi identificada nos doentes 1, 4 e 12. No entanto, apenas no doente 4 se apresentava em homozigotia. O estudo da alteração na família do doente 4, através de duas metodologias distintas, comprovou a hereditariedade desta mutação, verificando-se que os pais eram heterozigóticos. A consanguinidade existente poderá contribuir para a maior probabilidade de surgir a mutação em homozigotia na descendência. O irmão saudável deste doente, terá

herdado o alelo normal dos seus progenitores. O irmão falecido, apresentava apresentava hemocromatose neonatal, tendo falecido precocemente. A sequenciação automática de DNA mostrou que este doente seria homozigótico mutante para a alteração c.749T>C, tal como o doente 4. Não foi possível fazer a confirmação do seu genótipo por PCR-RFLP devido à escassez de amostra, que era proveniente da extracção do papel de Guthrie, que continha sangue colhido para o referido cartão na fase neonatal, que se encontrava em arquivo.

A PCR-RFLP efectuada para a alteração c.749T>C apresenta alguns pontos críticos, tal como seria de esperar, tendo conta o elevado número de regiões reconhecidas pela enzima, que originava vários fragmentos, alguns tão pequenos e tão próximos como 21 e 23 bp. Apesar desta condicionante, foi possível determinar o genótipo das amostras, que foi o esperado.

É importante notar que os doentes 1 e 12 apresentavam o mesmo genótipo, para a alteração patogénica encontrada no exão, que os pais do doente 4, o que sugere a questão pertinente de até que ponto esta alteração em heterozigotia pode contribuir para o quadro clínico apresentado pelos doentes. Embora não seja de excluir que os pais do doente 4 possam apresentar alguma alteração clínica mesmo que subliminar, a mutação identificada em heterozigotia não pode ser unicamente responsável pela gravidade do fenótipo clínico dos doentes em causa. No entanto, é um facto importante, referir 2 casos descrito na literatura por, Freisinger e seus colaboradores, sobre duas crianças com esta mutação (c.749T>C), ambas apresentando um quadro clínico comum com envolvimento hepático e acidose láctica (Freisinger *et al.*, 2006). É ainda de salientar o facto de a doente 1 apresentar outra alteração patogénica no gene *DGUOK* (c.353G>A), o que sugere a possibilidade de um efeito sinérgico resultante da presença destas duas mutações em conjunto. Assim, seria também pertinente sequenciar o fragmento correspondente ao exão 3 nos pais do doente 4 para pesquisar a existência desta alteração.

A análise do fenótipo apresentado pelos três doentes que apresentam mutação no exão 6 (1, 4 e 12) permite identificar um ponto em comum, todos apresentavam insuficiência hepática, tendo-se conhecimento de que dois desses doentes efectuaram transplante hepático (doentes 4 e 12), possuindo-se informação de que a doente 12 já faleceu.

Foi detectada a variação de sequência c.509A>G, exão 4, em heterozigotiana doente 10, descrita anteriormente como patogénica por Freisinger e colaboradores (Freisinger *et al.*, 2006), também em heretozigotia, numa criança de 3 meses, com registos de envolvimento hepático e muscular, *nistagmus* e perda de audição. Esta mutação leva à alteração de glutamina por arginina (p.Q170R). A pesquisa desta alteração em bases de dados bioinformáticas identificou esta variação como o SNP rs74874677. O uso do *software PolyPhen-2*[®] revelou *score* máximo, à semelhança das mutações provavelmente patogénicas apresentadas anteriormente (Figura 15). A confirmação desta alteração por sequenciação no sentido inverso permitiu confirmar a sua presença na sequência. No entanto o estudo com restrição enzimática não foi efectuado devido ao limite de tempo disponível para terminar este estudo. Futuramente, será importante efectuar essa análise, pois a confirmação de mutações por dois métodos, é bastante relevante tendo em conta que se trata de uma alteração com impacto na estrutura/ função da proteína desoxi-guanosina cinase. É curioso referir que, apesar da mutação detectada, esta doente já atingiu a maioridade, um facto raro em doentes com deficiência na deso-xiguanosina cinase.

A variação de sequência c.159G>A, detectada no exão 2, na amostra 17, corresponde ao rs62641680, um SNP já descrito nas bases de dados disponíveis. Esta alteração é uma mutação silenciosa, visto que não tem como consequência alteração do aminoácido, pois esta substituição de nucleótido, origina um codão que irá codificar, igualmente, treonina.

No intrão 2 foi identificada a alteração IVS3-190A>C (doente 14). No intrão 3 foram identificadas as variações de sequência IVS3+112A>G (doentes 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 e 17) e IVS3-62C>A (doente 5). No intrão 4 foi verificada a alteração IVS4+221T>C nos (doentes 6, 7, 8, 9). Estas quatro variações intrónicas, identificadas como SNPs nas bases de dados, encontram-se bastante afastadas da zona de início/fim dos exões, sendo improvável o seu efeito no *splicing*. Contudo não se pode excluir o seu envolvimento na causa da doença. Dadas as limitações técnicas actuais, ainda não é possível demonstrar ou esclarecer o seu papel na doença. Por outro lado, estudos posteriores em controlos saudáveis poderá ajudar a esclarecer se se tratam de variações normais na população.

Foi identificada a alteração heterozigótica c.-133T>C no doente 6. Esta alteração está localizada no promotor do gene. Por limitações de tempo, não foi possível fazer mais estudos, sendo necessário prosseguir no sentido de compreender se esta alteração pode ser responsável pelo fenótipo clínico.

Na região 3'UTR (amostras 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16 e 17) foi identificada a variação c.*13A>T, homozigótica em quatro doentes e heterozigótica em oito.

Exceptuando a alteração IVS3-62C>A, todas as restantes alterações descritas localizadas em região não codificante já se encontram identificadas como SNP. Para nosso conhecimento, esta trata-se de uma alteração nova, não descrita nas bases de dados pesquisadas nem na literatura.

Foi efectuado estudo de *splicing*, com o *software NNSPLICE v. 0.9*[®] para alterações que se encontrassem até um máximo de 50 bp antes ou após o exão, sendo que, a única que cumpria este parâmetro era a alteração c.*13A>T. Os resultados estão apresentados na Figura 16, sendo possível verificar que é pouco provável que haja alteração do *splicing*, dado o score obtido.

Os doentes 11, 14, 16 e 17 não apresentaram depleção em nenhum dos tecidos analisados para esse parâmetro. No entanto, tendo em conta as

características do mtDNA, poderiam apresentar depleção num tecido não estudado, mediante as alterações clínicas apresentadas, daí a justificação para o estudo do gene *DGUOK*. No entanto, a sintomatologia clínica apresentada era sugestiva, e o estudo prévio de número de cópias de mtDNA no miocárdio também indicou valores reduzidos para os doentes 11, 16 e 17, embora estes resultados ainda não estejam validados, porque os valores de referência para este tecido estão a ser estabelecidos. Em todo o caso, o estudo genético nestes doentes apenas permitiu detectar polimorfismos na região intrónica, que foram encontrados também noutros doentes. A sua relevância dependerá de estudos futuros..

No sentido de estudar as alterações nas populações controlo, outras técnicas de genotipagem poderão ser utilizadas neste tipo de estudos, nomeadamente a *High Resolution Melting* (HRM), um método relativamente recente para analisar e identificar variações de sequência, com base nas temperaturas de *melting* de amostras de DNA. Este método tem a capacidade de capturar um grande número de pontos de fluorescência consoante a temperatura, revelando alta precisão (Reed *et al.*, 2007). Esta abordagem foi iniciada para o estudo da alteração c.749T>C, com resultados promissores. No entanto, devido a limitações de tempo, não foi possível validar o ensaio, não sendo, por isso, os resultados apresentados.

Podemos concluir que 35% das amostras em estudo apresentam mutações já identificadas em outros estudos publicados. Esta percentagem é bastante significativa e evidencia, tal como esperado, a relação entre MDS e mutações no gene *DGUOK*, confirmando o planeamento adequado do estudo. A maior parte das alterações foi identificada em heterozigotia (68%), uma proporção superior em relação às alterações encontradas em homozigotia (32%).

As amostras que não apresentaram variações de sequência patogénicas deverão ser posteriormente analisadas para outros genes relacionados com MDS, como o *TWINKLE* e o *TK2*. O estudo de MDS associado ao gene *TWINKLE* foi já

iniciado no decurso deste trabalho, mas ainda se encontra em implementação no LBG.

Embora a MDS seja uma síndrome sem cura disponível, a identificação do gene responsável pela causa da doença, tal como outras análises importantes, como a avaliação da funcionalidade dos complexos da CRM, contribui para o diagnóstico, bem como poderá permitir aconselhamento genético e ou diagnóstico pré-natal.

Como sabemos, o aparecimento destas patologias no seio familiar causa muito sofrimento, muitas vezes, por os familiares não conseguirem compreender a sua origem e a sua multiplicidade de efeitos. Desta forma, o diagnóstico de MDS associada ao *DGUOK* aliado ao estudo genético da família é também muito importante para compreensão da origem da síndrome e planeamento de nova gravidez por parte dos pais de crianças que apresentam estas patologias.

6. Conclusão

O trabalho realizado tinha como objectivo a análise do gene *DGUOK* para identificar alterações patogénicas subjacentes à (suspeita de) depleção do mtDNA, de modo a explicar o quadro clínico apresentado pelos doentes. As amostras correspondentes aos 17 doentes em estudo foram amplificadas e o seu DNA sequenciado com sucesso. A análise dos resultados permitiu detectar variações de sequência em todos os doentes estudados. Foram identificadas 11 variações de sequência diferentes: 5 na região codificante, 4 intrónicas, 1 no promotor e 1 na região 3'UTR.

Quatro das cinco alterações de sequência identificadas na zona codificante são mutações *missense* de acordo com o estudo *in silico* efectuado e referências consultadas. Destas, as mais frequentes foram c.749T>C (3 doentes) e c.677A>G (2 doentes), podendo-se concluir que uma das apresentações clínicas mais indicadas para o estudo do gene *DGUOK* inclui a insuficiência hepática aguda na criança, particularmente no período neonatal. As alterações c.353G>A, c.749T>C e c.677A>G foram confirmadas por restrição enzimática. O estudo familiar dos doentes 3 e 4 permitiu confirmar a hereditariedade autossómica recessiva.

Nas amostras que não apresentam variação de sequência relevante será aconselhável o estudo de outros genes relacionados com MDS. Futuramente, seria também importante estudar a possibilidade de algumas alterações actuarem sinergisticamente. O estudo mais detalhado de variações de sequência localizadas nos promotores e nas sequências reguladoras poderá fornecer novas perspectivas no estudo das citopatias mitocondriais. Embora seja difícil obter um elevado número de amostras, dado que se trata de doenças raras e dada a baixa incidência da MDS e a morte precoce das crianças afectadas, seria relevante analisar uma amostragem de maior dimensão para se poderem tirar conclusões mais definitivas. Estudos funcionais são recomendados, para avaliar o impacto das alterações na proteína.

O diagnóstico de citopatia mitocondrial associada ao gene *DGUOK* foi implementado no laboratório de acolhimento.

Apesar do presente trabalho ainda necessitar de mais dados para se poderem tirar conclusões definitivas, trata-se de uma contribuição importante no diagnóstico genético nas MDS, que são doenças raras, e cujo diagnóstico definitivo é muitas vezes difícil de obter, dadas as inúmeras possibilidades que podem estar subjacentes à causa da depleção.

Referências

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010), A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4):248-249.
- Alberio S, Mineri R, Tiranti V, Zeviani M (2007), Depletion of mtDNA: Syndromes and genes. *Mitochondrion*, 7: 6-12.
- Bai R-K & Wong L-JC (2005), Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease. *Journal of Molecular Diagnostics* 7 (5): 613-622.
- Brahimi N, Jambou M, Sarzi E, Serre V, Boddaert N, Romano S, de Lonlay P, Slama A, Munnich A, Rötig A, Bonnefont JP, Lebre AS (2009), The first founder DGUOK mutation associated with hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism* 97: 221-226.
- Cohen BH & Gold D (2001), Mitochondrial cytopathy in adults: what we know so far. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 68 (7): 625-641.
- Copeland WC (2008). Inherited Mitochondrial Diseases of DNA Replication. *Annu Rev Med*,. 59: 131-146.
- Desjardins P & Conklin D (2010), NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1-4.
- DiMauro S (2004), Mitochondrial medicine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1659: 107-114.
- Dimmock DP, Dunn JK, Feigenbaum A, Rupa A, Horvath R, Freisinger P, Mousson de Camaret B, Wong LJ, Scaglia F (2008). Abnormal neurological Features Predict Poor Survival and Should Preclude Liver Transplantation in Patients with Deoxyguanosine kinase Deficiency. *Liver Transplantation*, 14: 1480-1485.
- Dimmock DP, Zhang Q, Carrozzo CD-VR., Shieh J, Tang L-Y, Truong C, Schmitt E, Sifry-Platt M, Lucioi S, Santorelli FM, Ficicioglu CH, Rodriguez M, Wierenga

- K, Enns GM, Longo N, Lipson MH, Vallance H, Craigen WJ, Scaglia F, Wong L-J (2008), Clinical and Molecular Features of Mitochondrial DNA Depletion Due to Mutations in Deoxyguanosine Kinase. *Human Mutation*, 29 (2): 330-1.
- Dunnen JT den, Antonarakis (2001), Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109: 121-124.
- Falkenberg M, Larsson N-G, Gustafsson CM (2007), DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem*, 76: 679-99.
- Fellman V & Kotarsky H (2011) Mitochondrial hepatopathies in the newborn period. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 16: 222-228.
- Freisinger P, Futterer N, Lankes E, Gempel K, Berger TM, Spalinger J, Hoerbe A, Schwantes C, Lindner M, Santer R, Burdelski M, Schaefer H, Sstzer B, Walker UA, Horváth R (2006). Hepatocerebral Mitochondrial DNA Depletion Syndrome Caused by Deoxyguanosine Kinase (DGUOK) Mutations. *Arch Neurol.*, 63: 1129-1134.
- Grazina M (2011). Mitochondrial Respiratory Chain: Biochemical Analysis and Criterion for Deficiency in Diagnosis. In *Mitochondrial disorders: Methods and Protocols*. Edited by Lee-Jun C. Wong. Chap 6. Humana Press. New York (in press).
- Grazina MMM (2004), Genoma Mitocondrial e Défice Energético no Diagnóstico das Doenças da Cadeia Respiratória Mitocondrial, Dissertação de Doutoramento. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
- Griffiths AJF (2005), *Introduction to genetic analysis*, 8th Edition, W. H. Freeman. New York and Basingstoke.
- Hudson G & Chinnery PF (2006), Mitochondrial DNA polymerase- γ and human disease. *Human Molecular Genetics* 15 (2): 244-242.
- Ji JQ, Dimmock D, Tang L-Y, Descartes M, Gomez R, Rutledge SL, Schmitt ES, Wong L-J (2010) A novel c.592-4_c.592-3delTT mutation in DGUOK gene causes exon skipping. *Mitochondrion* 10: 188-191.

- Johansson M, Bajalica-Lagercrantz S, Lagercrantz J, Karlsson A (1996), Localization of the Human Deoxyguanosine Kinase Gene (DGUOK) to Chromosome 2p13. *Genomics*, 38: 450-451.
- Johns DR (1995), Mitochondrial DNA and Disease. *The New England Journal of Medicine*, 333 (10): 638-644.
- Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998), Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genetics*, 18: 231-236.
- Lehninger AL (2005), *Principles of Biochemistry*, 5th Edition. W.H. Freeman: New York.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J (2003), *Molecular Cell Biology*, 5th Edition. W .H. Freeman & Co: New York , USA.
- Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962), A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J. Clin. Invest*, 41 (9): 1776-1804.
- Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG (1999), *Biochemistry*, 3rd Edition. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Metzenberg S (2007), *Working with DNA*. Taylor & Francis Group, New York.
- Moraes CT, Shanske S, Tritschler H-J, Aprille JR, Andretta F, Bonilla E, Schon E A, DiMauro S (1991), mtDNA Depletion with Variable Tissue Expression: A Novel Genetic Abnormality in Mitochondrial Diseases. *Am. J. Hum. Genet.*, 48: 492-501.

- 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 Harb Symp Quant Biol*, 51 (1): 263-273.
- Munnich A, Rötig A, Chretien D, Cormier V, Bourgeron T, Bonnefont JP, Saudubray JM, Rustin P (1996). Clinical presentation of mitochondrial disorders in childhood. *J Inher Metab Dis*. 19(4): 521-7.
- Nadege B, Patrick L, Rodrigue R (2009), Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 14: 4015-4034.
- Naviaux RK, Nguyen KV (2004), POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Annals of Neurology*, 55(5): 706-712.
- Poulton J, Hirano M, Spinazzola A, Arenas Hernandez M, Jardel C, Lombès A, Czermin B, Horvath R, Taanman JW, Rötig A, Zeviani M, Fratter C (2009), Collated mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) depletion syndrome (excluding the mitochondrial gamma polymerase, POLG1). *Biochimica et Biophysica Acta* 1792: 1109-1112.
- Rahman S & Poulton J (2009), Diagnosis of mitochondrial DNA depletion syndromes. *Arch Dis Child* 94: 3-5.
- Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*. 8(6): 597-608.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997), Improved Splice Site Detection in Genie. *J Comp Biol* 4(3): 311-23.
- Regateiro FJ (2003). *Manual de Genética Médica*. 1ª Edição. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Rozen S & Skaletsky HJ (2000), Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

- Saada-Reisch A (2004). Deoxyribonucleoside Kinases in Mitochondrial DNA Depletion. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 23: 1205-1215.
- Sarzi E, Bourdon A, Cherétien D, Zarhrate M, Corcos J, Slama A, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Munnich A, Rötig A (2007), Mitochondrial DNA Depletion is a Prevalent Cause of Multiple Respiratory Chain Deficiency in Childhood. *J Pediatr* 105: 531-4.
- Scaglia F, Sutton VR, Bodamer OA, Vogel H, Shapira SK, Naviaux RK, Vladutiu GD (2001), Mitochondrial DNA depletion associated with partial complex II and IV deficiencies and 3-methylglutaconic aciduria. *J Child Neurol* 16(2): 136-8.
- Schapira AHV (2006), Mitochondrial disease. *Lancet* 368:70-82.
- Simon DK & Johns DR (1999), Mitochondrial Disorders: Clinical and Genetic Features, *Annual Review of Medicine*, 50: 111-127.
- Spinazzola A, Invernizzi F, Carrara F, Lamantea E, Donati A, DiRocco M, Giordano I, Meznaric-Petrusa M, Baruffini E, Ferrero I, Zeviani M (2009). Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *J Inher Metab Dis.*, 32: 143-158.
- Spinazzola A & Zeviani M (2009), Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *Journal of Internal Medicine* 265: 174-192.
- Stellwagen NC (2009), Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*, 30 (1): 118-195.
- Suomalainen A & Isohanni P (2010). Mitochondrial DNA depletion syndromes – Many genes, common mechanisms. *Neuromuscular Disorders*, 20: 429-437.
- Viljoen GF, Neland LH, Crowther JR (2005), *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer. The Netherlands.
- Wallace DC, Fan W, Procaccio V (2010), Mitochondrial Energetics and Therapeutics. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, 5: 297-348.

Wang L, Limongelli A, Vila MR, Carrara F, Zeviani M, Eriksson S (2005), Molecular insight into mitochondrial DNA depletion syndrome in two patients with novel mutations in the deoxyguanosine kinase and thymidine kinase 2 genes. *Mol. Genet. Metab.* 84: 75–82.

Wong L-JC (2007), Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. *Mitochondrion* 7: 45-52.

Wong L-JC & Boles R (2005), Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Review. Clinica Chimica Acta*, 354:1-20.