



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Investigação do mtDNA nas doenças de Huntington e Parkinson

Sabrina Fernandes

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Investigação do mtDNA nas doenças de Huntington e Parkinson

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

Sabrina Fernandes

2012

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

Copyright© Sabrina Fernandes e Manuela Grazina, 2012.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e do orientador científico e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a autorização e referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and scientific supervisor and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper authorization and acknowledgment.

Uma parte do trabalho experimental incluída nesta dissertação (doença de Huntington) está integrada no projeto PTDC/SAU-FCF/108056/2008, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Agradecimentos

Reconhecendo que este trabalho é fruto de apoio incondicional prestado por várias pessoas e instituições, a estas exprimo o meu profundo sentimento de gratidão. Mesmo com o risco de não mencionar todos, passo a mencionar alguns:

Às minhas professoras orientadoras, Professora Doutora Maria Manuela Monteiro Grazina e Professora Doutora Ana Cristina Carvalho Rego, pelo apoio, ensinamentos e confiança que depositaram, além da disponibilização do laboratório e dos materiais para este trabalho. O meu sincero obrigado por se terem disponibilizado prontamente na realização deste trabalho.

Agradeço ao Professor António Manuel Santos Carriço Portugal por ter aceite ser meu orientador interno na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, pela confiança e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

A toda a equipa do Laboratório de Bioquímica Genética, agradeço pelo apoio e disponibilidade que sempre me prestaram, em especial à Mestre Maria João, ao Doutor João Pratas e à Marta Simões por tudo que me têm transmitido, pela paciência e por tudo que me ajudaram neste trabalho.

À Joana Rodrigues pela eficiência do seu trabalho e disponibilidade para comigo, uma vez que foi essencial para a obtenção do material biológico utilizado no presente trabalho.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram nos momentos difíceis, pelos incríveis momentos de descontração e simplesmente por tudo aquilo que eles são para mim, Cristiana, Duarte, Vera.

À minha mana Cata simplesmente pelo apoio, confiança, paciência, cumplicidade e amizade que nos liga desde o secundário.

Aos meus amigos e colegas de licenciatura/mestrado, Maria João, Ismael Neiva, Tânia Afonso, Cláudia Amaral, Rita Fonseca, Sónia André, Daniela Pereira, Mafalda Santos, e outros pelos bons momentos passados juntos, pelo carinho e amizade que foi criada ao longo destes anos.

Às minhas colegas e amigas do laboratório, Daniela Luís e Tânia Sousa pela força, incentivo, carinho e apoio incondicional ao longo desta etapa.

Aos meus **pais** pelo imenso amor, carinho e apoio que sempre deram para me tornar uma pessoa cada vez melhor. À minha **família** pelo estímulo nos momentos de desânimo e pelo carinho na hora certa. À minha **avó** pelo apoio incondicional ao longo deste percurso.

Índice

Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	viii
Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
1 Introdução	1
1.1 A doença de Huntington	2
1.1.1 Características clínicas da DH	3
1.1.2 Epidemiologia da DH	6
1.1.3 Patologia da DH	6
1.1.3.1 A proteína huntingtina	8
1.1.4 Genética da DH	10
1.1.5 Cíbridos e DH	12
1.2 A doença de parkinson	14
1.2.1 Características clínicas da DP	15
1.2.2 Epidemiologia da DP	17
1.2.3 Patologia da DP	18
1.2.3.1 A alfa-sinucleína na doença de Parkinson	18
1.2.4 Genética da DP	21
1.3 A mitocôndria e o DNA mitocondrial	23
1.3.1 Características particulares do mtDNA	27
1.3.2 Complexo I – NADH Desidrogenase e DH e DP	29
1.3.3 A disfunção mitocondrial nas doenças de Huntington e Parkinson	31
2 Objetivos	34
3 Material e métodos	36
3.1 Amostras biológicas	37
3.1.1 Células Rho-0	37
3.1.2 Modelo celular de doença de Parkinson	38
3.2 Extração de DNA	39
3.3 Quantificação de DNA	40
3.4 PCR em tempo real quantitativo (qPCR-RT)	40

3.5	Amplificação dos sete genes <i>MT-ND</i> no modelo de DP	43
3.6	Eletroforese em gel de agarose	47
3.7	Purificação dos produtos de PCR	48
3.8	PCR de sequenciação e sequenciação automática	49
3.9	Análise <i>in silico</i>	50
3.10	Análise estatística	51
4	Resultados	52
4.1	Quantificação do número de cópias de mtDNA	53
4.2	Sequenciação dos sete genes <i>MT-ND</i> nas amostras de DP	55
5	Discussão	58
5.1	Quantificação do número de cópias de mtDNA nas amostras de DH	60
5.2	Análise das amostras de DP	61
6	Considerações finais	65
7	Referências bibliográficas	68

Índice de figuras

Figura 1	Descrição da doença de Huntington por George Huntington	2
Figura 2	Áreas do cérebro afetadas na doença de Huntington	3
Figura 3	Representação do gene <i>HD</i> ou <i>IT15</i> e do impacto do tamanho das repetições de poliglutamina no início da DH	11
Figura 4	A via nigro-estriatal apresentada em condições normais e em condições patológicas	15
Figura 5	Representação esquemática de alfa-sinucleína humana	19
Figura 6	Imagem representativa de uma mitocôndria	23
Figura 7	Representação esquemática da fosforilação oxidativa	25
Figura 8	O genoma mitocondrial humano	26
Figura 9	Esquema representativo de heteroplasmia vs. homoplasmia	28
Figura 10	Representação esquemática da estrutura do complexo I mitocondrial de mamíferos	30
Figura 11	Representação esquemática da amplificação de DNA com <i>SYBR Green</i> , por PCR em tempo real	41
Figura 12	Curva de amplificação de qPCR-RT	42
Figura 13	Representação esquemática das etapas da PCR	45
Figura 14	Número de cópias de mtDNA/célula, para as células controlo e doente, para as diferentes concentrações de BrEt a que foram expostas	53
Figura 15	Número de cópias de mtDNA/célula, para as amostras de Parkinson, para as condições +Dox e -Dox	54
Figura 16	Exemplo de uma imagem de gel de agarose corado com brometo de etídeo, relativo à amplificação de um fragmento em estudo	55
Figura 17	Representação do eletroferograma que mostra o resultado obtido por sequenciação automática, com a alteração detetada (m.11016G>A)	55
Figura 18	(A) Representação da previsão obtida pela ferramenta <i>Polyphen-2</i> [®]	56
	(B) Representação da previsão obtida pela ferramenta <i>SIFT</i> [®]	57

Índice de tabelas

Tabela 1	Classificação do risco de transmissão da DH para a descendência, tendo em conta o número de repetições CAG	11
Tabela 2	Caracterização das amostras das linhas celulares de linfoblastos	38
Tabela 3	Localização dos genes <i>MT-ND</i> no genoma mitocondrial humano	46
Tabela 4	Características dos <i>primers</i> utilizados neste estudo	47
Tabela 5	Resumo da informação obtida do estudo <i>in silico</i> para a alteração m.11016G>A	56

Abreviaturas

°C	Graus Celcius
λ	Lambda, unidade de comprimento de onda
μ	Micro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
ADP	Adenosina difosfato
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato
β2M	β2 microglobulina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês <i>brain derived neurotrophic factor</i>)
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
CTE	Cadeia transportadora de eletrões
DH	Doença de Huntington (do inglês <i>Huntington's disease</i>)
ddNTP	Di-desoxi-nucleótido, N= A (Adenina), C (Citosina), G (Guanina), T (Timina)
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico (do inglês <i>deoxy-ribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxinucleótido, N= A (Adenina), C (Citosina), G (Guanina), T (Timina)
DP	Doença de Parkinson (do inglês <i>Parkinson's disease</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
dsDNA	Cadeia dupla de DNA (do inglês <i>double-stranded DNA</i>)
HEAT	Do inglês <i>Huntington-Elongation-A subunit-TOR</i>
Htt	Proteína huntingtina
IINs	Inclusões intranucleares neuronais
IT15	Do inglês <i>Interesting transcript 15</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
L-DOPA	L-3,4- dihidroxifenilalanina
mPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial (do inglês <i>mitochondrial permeability transition pore</i>)
mtDNA	DNA mitocondrial (do inglês <i>mitochondrial DNA</i>)

mtHtt	Huntingtina mutante (do inglês <i>mutant huntingtin</i>)
Min	Minuto
MT-ND	Subunidades da NADH desidrogenase codificadas pelo mtDNA
NAC	Do inglês <i>non amyloid component</i>
nDNA	DNA nuclear (do inglês <i>nuclear DNA</i>)
NMDA	Do inglês <i>N-Methyl-D-aspartate</i>
OXPHOS	Do inglês <i>Oxidative Phosphorylation</i>
pb	Par de bases
PCR	Reação da polimerase em cadeia (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PolyQ	Do inglês <i>polyglutamine</i>
qPCR-RT	PCR em tempo real quantitativo (do inglês <i>quantitative Real Time PCR</i>)
Rho-0 (ρ^0)	Célula desprovida de mtDNA
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
ROS	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
Ser	Serina
ssDNA	Cadeia simples de DNA (do inglês <i>single-stranded DNA</i>)
TE	Tris EDTA
tRNA	Ácido ribonucleico de transferência
UV	Ultravioleta
V	Volt

Resumo

As doenças de Huntington (DH) e Parkinson (DP) são duas patologias neurodegenerativas que têm sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos. A DH é uma doença autossômica dominante causada pela expansão de uma repetição do trinucleótido CAG no gene *IT15* ou *HD*, que codifica a proteína huntingtina (Htt). Caracteriza-se por uma atrofia do núcleo caudado e do putamen. Por sua vez, a DP caracteriza-se principalmente por uma perda dos neurónios dopaminérgicos localizados na substância *nigra*, sendo cerca de 5% dos casos hereditários. Estes estão associados a mutações em genes que codificam proteínas, nomeadamente a alfa-sinucleína.

A DH pode estar relacionada com vários mecanismos patogénicos, com destaque para o envolvimento da mitocôndria, nomeadamente no que se refere ao stress oxidativo, comprometimento no transporte de cálcio, disfunção metabólica, entre outros. Neste sentido, torna-se importante o estudo do mtDNA, que desempenha um papel importante em diversas doenças neurodegenerativas. Os cíbridos tornaram-se uma abordagem útil no estudo de defeitos causados por mutações a nível do mtDNA, nomeadamente na DH. Porém, para atingir este objetivo é necessário, em primeiro lugar, obter células Rho-0. Desta forma, é essencial a confirmação de uma depleção total de mtDNA nestas células. Neste trabalho, pretendeu-se alcançar esse objetivo através da quantificação do número de cópias de mtDNA, em controlos e doente de Huntington, através de PCR em tempo real.

Na DP, também também existem inúmeras evidências de envolvimento da mitocôndria nos mecanismos etiopatogénicos que levam à doença. Foi reconhecido que a alfa-sinucleína desempenha um papel crucial nesta doença, ocorrendo interação com a mitocôndria, que pode ser importante nos mecanismos subjacentes à doença. Assim, com o fim de tentar compreender uma possível relação entre o mtDNA e a expressão desta proteína, recorreu-se a um sistema *Tet-off*, do qual resulta uma expressão normal ou sobre-expressão da alfa-sinucleína. Para esta análise procedeu-se à medição do número de cópias de mtDNA em células que

expressavam a proteína em questão nas condições referidas. No sentido de investigar alterações no mtDNA, foi também objectivo proceder à sequenciação do mtDNA, em particular dos sete genes mitocondriais *MT-ND*, que codificam subunidades do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial.

Na quantificação do número de cópias em células Rho-0, não se observou uma depleção total do mtDNA. Pelo contrário, detetou-se um número elevado de cópias, quer nas células controlo, quer nas células de doente. Foram usadas células expostas a 0, 50 e 75 ng/mL de brometo de etídeo (BrEt). Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 0 e 50 ng/mL e entre 0 e 75 ng/mL, para as células controlo. Nas concentrações usadas de BrEt nas células de doente, não se observaram diferenças estatisticamente significativas. Relativamente ao número de cópias para as condições +Dox e -Dox das células de DP, também não se verificou uma diferença estatisticamente significativa. Já no que toca à sequenciação dos genes *MT-ND* nestas células, foi detetada a alteração 11016 G>A para ambas as condições, não tendo sido detetadas variações devidas à alfa-sinucleína.

Este trabalho permitiu entender que a PCR em tempo real poderá ser utilizada como alternativa a um conjunto de técnicas utilizadas em diversos estudos no sentido de averiguar a depleção total de mtDNA, visto ser mais simples e rápido. Apesar de a alteração detetada se tratar de um polimorfismo, de ter sido encontrada nas duas condições e de não parecer existir uma relação entre o número de cópias nestas condições, não se pode descartar a possível relação do mtDNA com a alfa-sinucleína na DP. Estudos anteriores mostraram uma associação entre alterações no mtDNA e a DP, tendo-se também observado que a inibição da atividade do complexo I poderá conduzir à agregação da proteína.

Palavras-chave: Huntington; Parkinson; Huntingtina; Alfa-sinucleína; mtDNA; Cíbridos; Complexo I.

Abstract

Huntington disease (HD) and Parkinson's disease (PD) are two neurodegenerative disorders that have been the subject of numerous studies in the recent years. HD is an autosomal dominant disease caused by expansion of a trinucleotide CAG repeat in the IT15 gene or HD, encoding the protein huntingtin (Htt). It's characterized by atrophy of the caudate nucleus and putamen. In turn, PD is characterized mainly by a loss of dopaminergic neurons located in the substantia nigra, and 5% of the cases are familial. These are associated with mutations in genes encoding proteins, in particular alpha-synuclein.

HD may be related to a wide variety of pathogenic mechanisms, with emphasis on mitochondria, in particular in relation to oxidative stress, impairment in calcium transport, metabolic dysfunction, among others. Accordingly, it is important to study the mtDNA, which plays an important role in several neurodegenerative diseases. Cybrids became a useful approach in the study of defects caused by mutations of mtDNA levels, particularly in HD. However, to achieve this goal it is first necessary to obtain Rho-0 cells. Thus, it is essential to confirm a total depletion of mtDNA in these cells. In this work we intended to achieve this objective by quantifying the number of copies of mtDNA in controls and Huntington patients, by real-time PCR.

With regard to PD, there's also evidence of a correlation with the mitochondria in the etiopathogenic mechanisms that lead to the disease. It was recognized that alpha-synuclein plays a crucial role in this disease, occurring interaction with mitochondria, which can be important in the mechanisms related to PD. Thus, in order to try to understand the interactions between the mtDNA and the expression of this, we used a Tet-off system, which results in a regular expression or over-expression of alpha-synuclein. For this analysis we carried out the measurement of mtDNA copy number in cells expressing the protein in question as indicated. In order to investigate changes in the mtDNA we also proceeded to mtDNA automated sequencing, in particular of the seven mitochondrial genes *MT-ND.*, which encode subunits of complex I of the mitochondrial respiratory chain.

In mtDNA copy number quantification of Rho-0 cells, there was not a total mtDNA depletion. On the opposite, it was quantified a high number of copies, either in control cells or patient cells. We used cells exposed to 0, 50 and 75 ng/mL of ethidium bromide. There was a statistically significant difference between the concentrations from 0 to 50 ng/mL and between 0 and 75 ng/mL, for the control cells. For the used ethidium bromide concentrations in patient cells, there were no statistically significant differences. For the copy number to the +Dox and -Dox conditions PD cells, there was also no statistically significant difference. In what regards the sequencing of the *MT-ND* genes in these cells it was detected the variation 11016 G> A for both conditions, and no variations due to alpha-synuclein were detected.

This work allowed us to understand that real-time PCR can be used as an alternative to a set of techniques used in several studies to determine the total depletion of mtDNA, since it is simpler and faster. Despite the variation detected is a polymorphism, found in both conditions and that did not seem to exist a relationship between the number of copies and the two studied conditions, it can't be excluded the possible relationship of mtDNA with alpha-synuclein in PD. Previous studies have shown an association between the mtDNA and mtDNA PD sequence variations and it was also observed that the inhibition of the activity of complex I may lead to protein aggregation.

Keywords: Huntington; Parkinson; Huntingtin; Alpha-synuclein; mtDNA; Cybrids; Complex I.

I - Introdução

As doenças neurodegenerativas constituem um problema grave de saúde pública. De facto, o número de doentes afetados continua a aumentar e existem poucas terapias disponíveis, podendo haver uma ligação entre o número crescente de doentes e o aumento da esperança média de vida (Brouillet *et al.*, 2005).

1.1 A doença de Huntington

Esta doença, também conhecida por Coreia de Huntington (“khoreia”, palavra grega para “dança”), foi descrita pela primeira vez em 1872 (Figura 1) pelo médico George Huntington (Durbach e Hayden, 1993). É num artigo que publica nesse ano que agrupa as observações feitas pelo seu pai e pelo seu avô, médicos generalistas em Long Island, de várias famílias afetadas em várias gerações. Assim, descreveu-a como uma coreia hereditária, caracterizada por um início tardio, evolução inevitável e uma tendência para loucura e suicídio (Huntington, 1872).

"The hereditary chorea, as I shall call it, is confined to certain and fortunately a few families, and has been transmitted to them, an heirloom from generations away back in the dim past. It is spoken of by those in whose veins the seeds of the disease are known to exist, with a kind of horror, and not at all alluded to except through dire necessity, when it is mentioned as "that disorder." It is attended generally by all the symptoms of common chorea, only in an aggravated degree, hardly ever manifesting itself until adult or middle life, and then coming on gradually but surely, increasing by degrees, and often occupying years in its development, until the hapless sufferer is but a quivering wreck of his former self.

"It is as common and is indeed, I believe, more "common among men than among women, while I am not aware that season or complexion has any influence in the matter. There are three marked peculiarities in this disease:

1. Its hereditary nature.
2. A tendency to insanity and suicide.
3. Its manifesting itself as a grave disease only in adult life.

Figura 1. Descrição da doença de Huntington por George Huntington em 1872.

Este texto foi extraído do artigo de George Huntington, escrito em 1972 no jornal *The Medical and Surgical Reporter: A Weekly Journal* (Philadelphia: S.W. Butler), vol. 26: 317–321. Introduction copyright 2003 American Psychiatric Publishing, Inc.

A doença de Huntington é uma patologia degenerativa progressiva do sistema nervoso central, caracterizada por uma perda de células neuronais

localizadas em zonas precisas do cérebro, o núcleo caudado e o putamen (estruturas do estriado). Estas zonas são preferencialmente afetadas (Figura 2), enquanto que o tálamo, o córtex e a substância branca subcortical são afetados mais parcial e tardiamente (de la Monte *et al.* 1988).

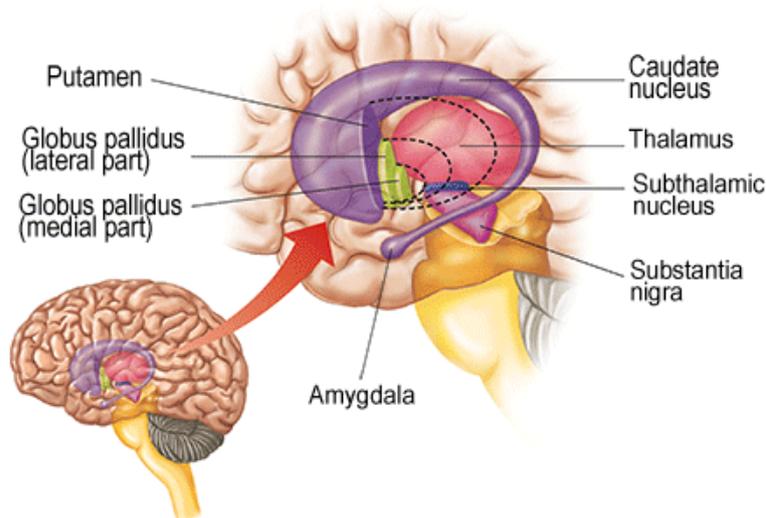


Figura 2. Áreas do cérebro afetadas na doença de Huntington (adaptado de Rhawn, 2000).

Trata-se de uma doença autossômica dominante hereditária, causada por uma expansão anormal de repetições de CAG no exão 1 no gene que codifica a huntingtina (Htt), localizado no cromossoma 4p16.3, resultando num maior número de repetições de poliglutaminas (*PolyQ*) na proteína Htt, que está na base da doença. Esta proteína atua como *scaffold protein*, regulando o tráfego de vesículas e organelos e vias de sinalização (Orr e Zoghbi, 2007; Shao e Diamond, 2007).

1.1.1 Características clínicas da DH

Do ponto de vista clínico, a DH apresenta três sinais clínicos característicos (Siabas, 1991; Mikaelian, 2001):

- perturbações motoras;
- perturbações psiquiátricas;
- perturbações cognitivas.

Desta forma, podem distinguir-se, segundo a evolução clínica, três formas de doença de Huntington: comum, precoce e tardia. As diferenças na idade de início e na evolução clínica podem implicar mecanismos fisiopatológicos diferentes, levando à necessidade de estratégias terapêuticas específicas.

As perturbações motoras caracterizam-se por hipercinesia involuntária e podem, inicialmente, assemelhar-se a simples gestos de nervosismo. Durante a evolução da doença, as perturbações motoras tornam-se mais evidentes e evoluem de uma forma inexorável, constituindo uma marca da patologia (Hefter *et al.*, 1987; Penney *et al.*, 1990; de Tommaso *et al.*, 2001).

Estas perturbações incluem (Hefter *et al.*, 1987; Penney *et al.*, 1990; de Tommaso *et al.*, 2001):

- A coreia: movimento involuntário, brusco, explosivo e imprevisível, acentuado pelo stress. Afeta várias partes do corpo, como a cara, o pescoço, o tronco e os membros (projeção dos braços para a frente e andar descoordenado);
- A bradicinesia: movimentos lentos;
- A acinesia: ausência de movimentos, observada numa fase terminal;
- A distonia: alteração ou perturbação da tonicidade dos músculos;
- A disartria: dificuldade na articulação e pronúncia das palavras, sem anomalias na escrita, leitura e compreensão;
- A disfagia: perturbações na deglutição, podendo levar a complicações pulmonares e à morte;
- A hipotonia: diminuição da tensão muscular ao nível dos braços e pernas;
- A hiper-reflexia: reflexos acentuados;
- Outros movimentos involuntários que dificultam gestos do quotidiano, como vestir-se ou escrever.

Para além do mau-estar que a doença induz por si só, e da degradação física dos doentes, estes apresentam quase sempre perturbações psiquiátricas, que podem levar a um estado depressivo.

Normalmente, os doentes ficam ansiosos, irritadiços, introvertidos, distraídos, apresentam um embotamento afetivo e podem demonstrar um sentimento de inferioridade e insucesso. Alguns autores consideram que este estado depressivo pode, por vezes, levar ao suicídio, sendo a taxa de suicídio em doentes de Huntington superior, relativamente à da população em geral. Os sintomas surgem frequentemente antes dos sinais motores e antes que a doença seja confirmada do ponto de vista médico (Bruyn, 1986; Caine, 1985). Além destes sintomas depressivos, os gostos pessoais destes doentes ou a sua função sexual pode mudar. Podem também ser desenvolvidos sintomas de paranóia semelhantes aos dos esquizofrénicos podendo levar por vezes à violência (Bruyn, 1986).

Os sinais cognitivos são precoces e precedem os sinais motores na sintomatologia da doença, tornando-se necessário muitas vezes os doentes ficarem aos cuidados de alguém (Hahn-Barma *et al.*, 1998). Contrariamente a outras patologias neurodegenerativas, o doente não sofre de desorientação espacial e temporal. Globalmente, ocorrem alterações psicomotoras (Panegyres, 2004) e os doentes queixam-se de perda de memória, problemas de organização e de planificação, frequentemente acompanhados muito por uma constante incapacidade de coordenação e de iniciação de tarefas complexas (Caine, 1985).

Caine e Fisher (1985) descreveram que o quotidiano intelectual, avaliado através da escala WAIS-R (Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised) (Wechsler, 1981), degrada-se paralelamente à evolução da doença. Alguns exercícios de avaliação incluem exercícios de aritmética, classificação de imagens e reconhecimento de símbolos (Kirkwood *et al.*, 2000). As anomalias detetadas pelos exercícios de aritmética evidenciam as perturbações de compreensão verbal e da memória auditiva a curto prazo. A classificação das imagens aponta para as anomalias da análise visual, da compreensão da causa à consequência e da reflexão sequencial. O reconhecimento de símbolos encontra-se diminuído pelas anomalias ao nível da velocidade do movimento ocular, da memória visual e da coordenação. A linguagem e a expressão oral também são afetadas, mas são mais evidentes as consequências relativamente aos problemas de pronúncia de palavras

e da expressão facial, do que a consequência da disfunção cognitiva (Brandt, 1991).

Os critérios utilizados para o diagnóstico da DH, tendo em conta as características descritas até agora, incluem:

- i) história familiar da DH;
- ii) défice motor progressivo associado a coreia ou rigidez sem outra causa definida;
- iii) alterações psiquiátricas com demência progressiva, sem outra causa.

Hoje em dia, os indivíduos que apresentam estes sintomas são submetidos ao teste genético, com vista a avaliar a presença da mutação associada à DH e confirmar o diagnóstico (Gil-Mohapel e Rego, 2011).

1.1.2 Epidemiologia da DH

A DH é uma doença que surge no adulto jovem (entre os 35 e 50 anos), exceto em raras exceções nas quais pode ter um início mais precoce, como aos 2 anos de idade, ou um início tardio, por volta dos 80 anos. Normalmente, os doentes sobrevivem cerca de 15-20 anos após os primeiros sintomas do início da doença (Kremer, 2002; Cattaneo *et al.*, 2005; Gil e Rego, 2008; Reddy *et al.*, 2009). A prevalência desta doença é muito menor em comparação com a doença de Alzheimer ou Parkinson (Munoz-Sanjuan e Bates, 2011). Tem uma prevalência de 5 a 10 em 100.000 habitantes em todo o mundo e estima-se que afete 4 a 10 em 100.000 indivíduos, maioritariamente de origem caucasiana (Kremer, 2002). Em Portugal, em 2007, de acordo com a Associação Portuguesa de doentes de Huntington, existiam entre 500 a 1.000 casos de DH numa população de 10.617.575 habitantes (APDH, 2007).

1.1.3 Patologia da DH

A doença de Huntington é caracterizada por uma degenerescência progressiva de um subconjunto de neurónios do estriado, os neurónios

piramidais corticais no córtex motor, frontal e occipital (Schippling *et al.*, 2009; Duff *et al.*, 2010; Paulsen *et al.*, 2010; Pavese *et al.*, 2010; Thu *et al.*, 2010). A forma mais comum de avaliar a neurodegenerescência em doentes de Huntington, consiste num sistema de graduação, aplicado em *post mortem*, desenvolvido por Vonsattel *et al.* (1985). De acordo com este sistema, a DH é classificada em 5 graus (0 a 4), associados a diferentes estádios de gravidade neuropatológica (Vonsattel e DiFiglia, 1998).

Relativamente ao estriado, os neurónios espinhosos de projeções médias (que correspondem a 95% da população neuronal dessa região) são a população de neurónios mais afetados (Albin *et al.*, 1989; Joel e Weiner, 1997). Foi observada uma atrofia do hipotálamo, que pode levar à perda de 40% do peso total do cérebro (Gusella, 2001; Kassubeck *et al.*, 2004). Além disso, a neuropatologia na doença de Huntington também é caracterizada pela acumulação de inclusões intranucleares neuronais (IINs) e agregação de neurites distróficas (DiFiglia *et al.*, 1997; Sapp *et al.*, 1999). Geralmente, verifica-se uma perda de massa cerebral nos doentes, antes da perda de peso corporal e do início dos sintomas neurológicos, em que as IINs surgem antes da perda de peso cerebral (Vonsattel e DiFiglia, 1998).

No que diz respeito às repetições de poliglutamina, são altamente polimórficas e o aumento do número a cada geração, quando herdadas por indivíduos do sexo masculino, está associado a um aparecimento mais precoce da doença, fenómeno que é designado por “antecipação” (Reddy *et al.*, 1999). A Huntingtina é uma proteína com 350 kDa, que é expressa de forma ubíqua no cérebro e tecidos periféricos. Mais especificamente, no cérebro, esta proteína encontra-se preferencialmente no citoplasma dos neurónios (Reddy *et al.*, 1999; Bates, 2005; Li e Li, 2004; Orr e Zoghbi, 2007). A huntingtina na forma *wild-type* tem um papel importante na sobrevivência das células, controlando as vias de apoptose, a regulação da maquinaria de transporte intracelular, o tráfego vesicular e a secreção. A mutação nesta proteína induz tanto uma perda como um ganho de função (Reiner *et al.*, 2003; Cattaneo *et al.*, 2005; Borrell-Pages *et al.*, 2006).

1.1.3.1 A proteína huntingtina

O papel fisiológico da huntingtina ainda não é conhecido com exatidão, mas, até ao momento, foram já apresentadas várias hipóteses. Conforme referido anteriormente, esta proteína é ubíqua e os seus níveis de expressão mais elevados são no cérebro e nos testículos (Borrell-Pages *et al.*, 2006). No cérebro é expressa pelos neurónios, assim como pelas células da glia (Shin *et al.*, 2005). Estudos realizados com modelos (ratos), nos quais o gene DH estava silenciado (*HD knock-out*) mostraram que a ausência da Htt era letal (Harjes e Wanker, 2003).

Existem vários estudos que atribuem diversas funções possíveis à proteína normal. Estes estudos sugerem que a proteína possa desempenhar um papel anti-apoptótico, estar envolvida na transcrição, na exocitose neuronal, participar na formação de sinapses ou ser necessária ao desenvolvimento embrionário (DiFiglia, 1995; Zeitlin *et al.*, 1995; Harjes e Wanker, 2003; Sugars e Rubinsztein, 2003; Massouh, 2007). Desta forma, não é adequado atribuir-se uma única função a esta proteína. A huntingtina deve ser considerada como uma molécula multifuncional, visto poder assumir conformações e papéis específicos, ao ter a capacidade de se ligar a outras proteínas, dependendo da sua localização e maturação na célula (Harjes e Wanker, 2003; Macdonald, 2003; Marcora, 2003; Li e Li, 2004).

A huntingtina mutada (mtHtt) é caracterizada por um domínio rico em glutamina ao nível do N-terminal. Os mecanismos pelos quais esta expansão *polyQ* tornam a proteína tóxica e, mais especificamente, causa a degenerescência selectiva de neurónios do estriado, são ainda pouco claros (Charvin, 2005). Nesse sentido, Sugars e Rubinsztein (2003) enfatizaram um ponto importante: os sintomas da doença de Huntington não devem ser somente considerados como a consequência de uma perda neuronal, mas também como a consequência da disfunção inicial das células, que têm um papel relevante no surgimento dos sintomas clínicos. Segundo Rangone *et al.* (2004), o papel da proteína mutada no surgimento da doença de Huntington situa-se a dois níveis. Por um lado, a própria mtHtt é tóxica e, por outro lado, a mutação leva à perda de propriedades benéficas da proteína funcional. Assim, ainda não está claramente definido de que forma a mtHtt causa

neurodegenerescência. Para além de três domínios HEAT (*Huntingtin-Elongation-A subunit-TOR*), que parecem estar relacionados com a interação de proteínas, as funções detalhadas da huntingtina permanecem desconhecidas (Andrade e Bork, 1995; Takano e Gusella, 2002). Na literatura, são encontrados estudos, indicando que a Htt interage com mais de 200 proteínas e que as interações anormais da proteína podem, em parte, levar à sua toxicidade (Sugars e Rubinsztein, 2003; Thomas, 2006).

As funções tóxicas adquiridas pela mtHtt podem envolver, quer a forma *full-length* da proteína *wild type*, quer o fragmento N-terminal, obtido pela clivagem realizada por várias proteases, que ainda não foram identificadas em detalhe (Damiano *et al.*, 2010). Como já foi mencionado, dados disponíveis sugerem que o mecanismo de acção da mtHtt está relacionado com um ganho de função, enquanto outros mostram uma ligação à perda de função. Os mecanismos propostos para um ganho de função da mtHtt incluem a modulação transcricional, agregação de proteínas e excitose (DiFiglia, 1990; Cha, 2000; Zuccato *et al.*, 2001; Ross, 2004; Fan e Raymond, 2007). Foi demonstrado que correntes de NMDAR e Ca^{2+} estavam aumentadas em neurónios espinhosos médios de ratos transgénicos (Fernandes *et al.*, 2007; Zeron *et al.*, 2002; Zeron *et al.*, 2004). Por outro lado, outros estudos referem a clivagem da mtHtt pela caspase 6, como um processo relacionado com a toxicidade mediada pela huntingtina (Graham *et al.*, 2006). No entanto, também há dados que revelam que a mtHtt leva à neurodegenerescência por um mecanismo de perda de função. Neste sentido, foi demonstrado que a Htt *wild type* regula a expressão do *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), que é um fator importante na sobrevivência neuronal do estriado. No que diz respeito a esta regulação, foi evidenciado que a mtHtt altera a expressão do gene *BDNF*, comprometendo, consequentemente, a sobrevivência neuronal e do tráfego de vesículas de BDNF (DiFiglia, 1990; Zuccato *et al.*, 2001; Zeron *et al.*, 2002; 2004; Zuccato *et al.*, 2003; Ross, 2004; Zeron *et al.*, 2004; Borrel-Pages *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2006; Fan, 2007; Fernandes *et al.*, 2007). O que parece acontecer é que os níveis de BDNF reduzidos no estriado tornariam os neurónios espinhosos médios muito vulneráveis, podendo este ser um mecanismo na base da DH. Deste modo, é possível que ambos os

mecanismos de ganho e perda de função coexistam e contribuam para a complexidade das vias moleculares subjacentes à DH (Damiano *et al.*, 2010).

1.1.4 Genética da DH

A doença de Huntington é uma patologia autossômica dominante que afeta tanto homens como mulheres. Geralmente, está relacionada com um antecedente familiar, exceto em caso de mutação *de novo* (muito raro). É caracterizada como uma doença de penetrância completa, isto é, a mutação exprime-se sempre ao nível do fenótipo, sendo que os filhos têm 50% de risco de desenvolver a doença (Gusella *et al.*, 1983).

Em 1983, foi identificado o fator genético responsável pela DH, no braço curto do cromossoma 4 (4p16.3), correspondente a um segmento de DNA instável, que contém uma expansão contínua de repetições do triplete CAG (Figura 3). Este trinucleótido localiza-se perto do terminal 5' do exão 1 do gene *Interesting Transcript 15 (IT15)*, que codifica a proteína huntingtina), com um tamanho de 200 kb e composto por 67 exões (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

A presença anormal e instável de uma expansão de tripletos de CAG, igual ou superior a 37, é responsável pelo fenótipo da doença (Kremer *et al.*, 1994). No entanto, pode existir uma penetrância incompleta para um número de repetições de CAG entre 35 e 40, apesar de ser considerada sempre completa a partir de 40 CAG e o gene normal possuir 9 a 34 CAG (Tabela 1). A presença de um número anormal de resíduos de glutamina confere à huntingtina uma alteração na sua conformação, interações e funções bioquímicas (Snell *et al.*, 1993).

Tabela 1. Classificação do risco de transmissão da DH para a descendência, tendo em conta o número de repetições CAG (adaptado de Mohapel e Rego, 2011).

Número de repetições CAG	Risco de transmissão para a descendência	Manifestação da Doença
< 28	Não há transmissão	Não há
28-35	Intermediário (no caso da ocorrência de mutações que levam a um aumento do número de repetições CAG na descendência)	Não há
35-40	Penetrância incompleta	Possibilidade de vir a manifestar ou início mais tardio
40-50	Penetrância completa	Na idade adulta
> 50	Penetrância completa	Precocemente (juvenil)

A mutação genética está presente à nascença, mas só se exprime clinicamente mais tarde. A idade de início dos sintomas da doença está relacionada com o comprimento da expansão CAG, que é inferior a 30 anos para formas longas e superior a 50 anos para formas curtas (Andrew *et al.*, 1993; Snell *et al.*, 1993).

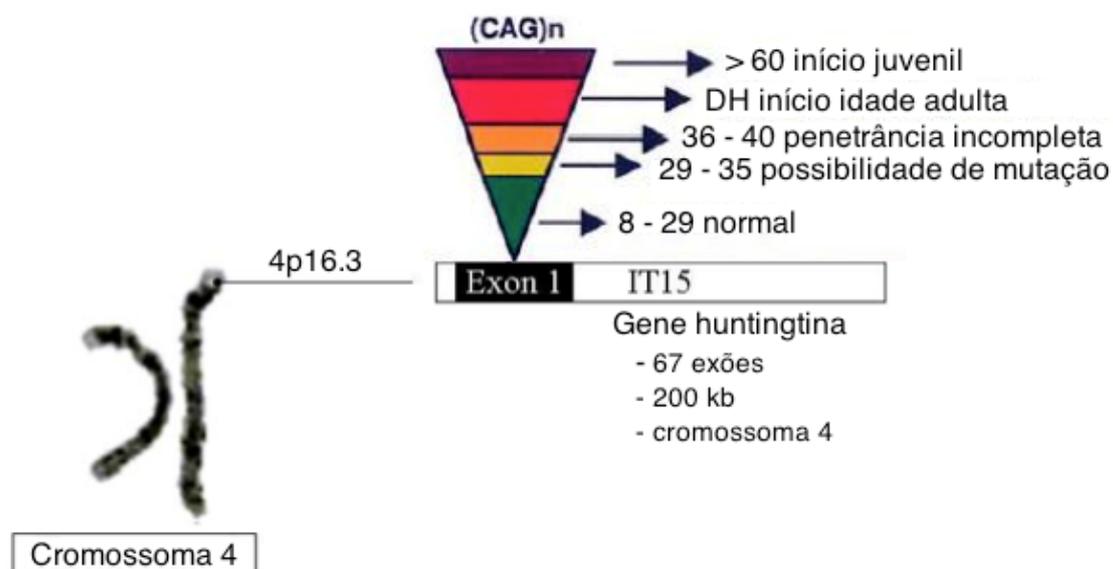


Figura 3. Representação do gene huntingtina (ou gene *DH* ou *IT15*) e impacto do tamanho das repetições de poliglutamina no início da DH (adaptado de Rego e de Almeida, 2005).

1.1.5 Cíbridos e DH

Nos últimos anos, os cíbridos têm sido uma ferramenta muito por vários investigadores, para explorar questões fundamentais do DNA mitocondrial (mtDNA), relacionadas com a biologia molecular. Diversos estudos mostraram que são úteis em casos de doenças neurodegenerativas relacionadas com disfunção mitocondrial, uma vez que permitem a transferência mitocondrial desses doentes, criando assim linhas de cíbridos que resumem e perpetuam os mesmos defeitos bioquímicos (Swerdlow, 2007).

Os cíbridos, ou células híbridas citoplasmáticas, são formados pela fusão de dois tipos celulares diferentes, a partir de uma célula Rho-0 (célula desprovida de mtDNA) para a qual é transferido o genoma mitocondrial de doentes ou de indivíduos saudáveis (controlo). Para a produção de cíbridos, é necessário, em primeiro lugar, obter células Rho-0 (Swerdlow, 2007).

Esta produção de cíbridos também pode ser efetuada a partir de plaquetas, que têm a vantagem de não possuírem núcleo e, portanto, não será necessário proceder previamente à eliminação do núcleo. No que diz respeito a este procedimento, é de referir que foi evoluindo ao longo dos anos. Na década de 60 utilizou-se brometo de etídeo, uma vez que este se intercala nas cadeias de DNA, devido à sua carga positiva em relação ao DNA, de carga negativa, resultando assim numa falha na replicação (Slonimski *et al.*, 1968; Goldring *et al.*, 1970). Quer nestes estudos, em leveduras, quer num estudo posterior numa linha celular eucariótica, observou-se uma depleção quase completa do mtDNA (Wiseman e Attardi, 1978). No entanto, foi em 1985 que se atingiu este objectivo por completo, numa linha de fibroblastos de galinha. Neste caso, para além de recorrerem ao brometo de etídeo, os autores basearam-se no facto de uma enzima requerida para a síntese de pirimidinas depender da função da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Assim, antecipando que a depleção do mtDNA resultaria no comprometimento da CRM e, conseqüentemente, da síntese de pirimidina, as células foram expostas a brometo de etídeo e a uridina (intermediária da via da síntese das pirimidinas). Tal parece ter facilitado a redução dos níveis de mtDNA, de 600 cópias por célula para

nenhuma cópia detectável (Gregoire *et al.*, 1984; Desjardin *et al.*, 1985). Em 1989 foi publicado o primeiro caso de sucesso em células humanas, tendo sido usado, para além de brometo de etídeo e uridina, também piruvato, para manter o potencial redox da célula (King e Attardi, 1989; King e Attardi, 1996).

Após obter células Rho-0, foi então possível proceder à transferência das mitocôndrias de outras células para estas, normalmente mediada por polietilenoglicol ou por injeção das mitocôndrias (King e Attardi, 1989).

1.2. A doença de Parkinson

As doenças neurodegenerativas relacionadas com o avanço da idade – e em particular a doença de Parkinson – são um problema de saúde pública que tem vindo a crescer. A seguir à doença de Alzheimer, a doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurológica mais frequente, mas, até hoje, não existe cura para nenhuma destas duas doenças (Rahkonen *et al.*, 2003).

De facto, inicialmente a descrição da doença de Parkinson fazia referência a sintomas motores, sem ter em conta qualquer tipo de “perturbação mental” (Parkinson, 1817). Foi um século depois que o neurologista Jean-Martin Charcot definiu “*The Shaking Palsy*”, observada por James Parkinson como uma síndrome distinta e designou-a como doença de Parkinson. Em 1912, Lewy descreveu as inclusões intraneuronais presentes no cérebro de indivíduos que sofrem desta doença, que, alguns anos mais tarde, foram designados de corpos de Lewy por Trétiakoff. Na década de 20, Joseph Babinski aponta para o facto de ocorrerem variações motoras nesta patologia. Hassler, em 1938, e Greenfield e Bosanquet em 1953, mostraram que a substância *nigra* mesencefálica é particularmente afetada e, alguns anos depois, foram Ehringer e Hornykiewicz quem descreveu uma deficiência em dopamina no estriado (Greenfield e Bosanquet, 1953; Ehringer e Hornykiewicz, 1960; Goetz *et al.*, 2001a; Goetz *et al.*, 2001b; Suchowersky e Furtado, 2004; Goetz, 2005). Foram associados casos de demência com a presença de corpos de Lewy difusos, corticais e subcorticais (Okazaki *et al.*, 1961). Desde então, foram descritos vários casos, nos quais a presença de corpos de Lewy difusos estavam associados ou a uma síndrome parkinsoniana isolada, ou a uma síndrome de demência, ou ainda à associação dos dois (Kosaka *et al.*, 1984).

Mais recentemente, o Professor Arvid Carlsson (Prémio Nobel de Medicina 2000), contribuiu para a descoberta da neurotransmissão mediada pela dopamina e do desenvolvimento de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), para o tratamento sintomático da doença de Parkinson (Manyam e Sanchez-Ramos, 1999).

A doença de Parkinson provoca tremores, rigidez muscular crónica, problemas no controlo dos movimentos e equilíbrio, assim como diversos outros sintomas neuromotores e neurológicos (Jakobsen e Jensen, 2003). Esta patologia é altamente debilitante, resultando principalmente na degenerescência dos neurónios dopaminérgicos (Figura 4) ao nível da substância *nigra* (Dauer e Przedborski, 2003).

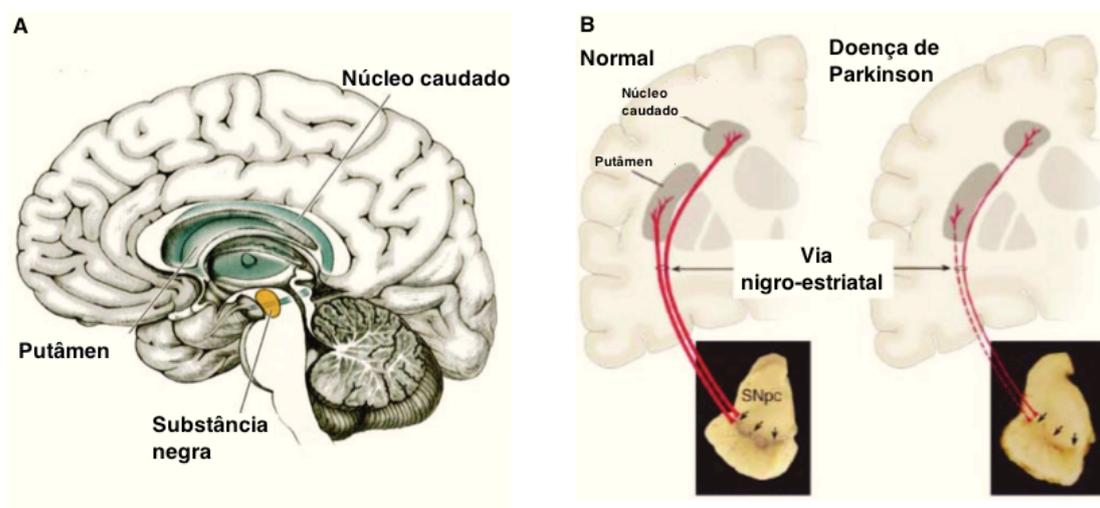


Figura 4. A via nigro-estriatal apresentada em condições normais e em condições patológicas. SNpc – *Substancia nigra pars compacta*. (A) (adaptado de Vinckel, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand); (B) (adaptado de Dauer W e Przedborski S, 2003).

Esta perda anormal de neurónios, induz a redução da estimulação dopaminérgica no estriado e, conseqüentemente, a uma desregulação das redes neuronais envolvidas no controlo das funções motoras. A partir do momento em que a doença é detectada a nível clínico, grande parte dos neurónios dopaminérgicos da via nigro-estriatal (mais de 70%) encontra-se já em processo degenerativo (Mc Geer *et al.*, 1988).

1.2.1 Características clínicas da DP

As manifestações e a progressão dos sintomas clínicos da doença de Parkinson são variáveis, em função do indivíduo e da fase da doença, podendo ser distribuídos ao longo de décadas. Em geral, esta doença neurodegenerativa leva a uma alteração progressiva e assimétrica das

capacidades motoras, afetando o controlo dos músculos. Estes distúrbios motores incapacitantes são designados de “parkinsonismo” (Lang e Lozano, 1998; Dauer e Przedborski, 2003; Weintraub *et al.*, 2008). Normalmente, consistem em tremor muscular no repouso (cabeça e braços), rigidez, lentidão (bradicinesia), ausência de movimento inconsciente normal, incapacidade de iniciar movimentos (acinesia), distúrbios da marcha, perda de reflexos da postura, problemas de equilíbrio, uma posição característica da postura e uma expressão facial reduzida (Olanow *et al.*, 2004).

Efetivamente, estes sintomas primários podem ser acompanhados por sintomas secundários, isto é, sintomas não motores, que contribuem consideravelmente para a deficiência e agravamento da qualidade de vida do doente. Estes sintomas podem variar de acordo com o indivíduo e com a fase da doença, mas nem sempre estão relacionados com a patologia de Parkinson. Assim, estes sintomas secundários incluem: alterações do humor, (depressão, ansiedade, apatia), danos cognitivos (problemas na fala, demência, confusão) e outros distúrbios, tais como dificuldades em engolir, perturbações do sono, disfunção sexual, disfunção da bexiga, problemas de pressão arterial, diminuição da sinalização da dor e perda do sentido de olfato (Lang e Lozano, 1998; Weintraub *et al.*, 2008). É de notar que a perda de sentido do olfato é usada como teste de diagnóstico, pois é um dos primeiros sintomas clínicos que surgem, mesmo antes dos tremores (Doty *et al.*, 1995).

O diagnóstico da DP é baseado na observação de sintomas clínicos, exames neurológicos e na resposta a medicamentos para Parkinson. No entanto, é comum surgirem dificuldades em realizar o diagnóstico, devido aos sintomas serem semelhantes aos de outras doenças. Os mais frequentemente confundidos são o tremor, a paralisia progressiva, o parkinsonismo induzido por fármacos e hidrocefalia de pressão normal. Além disso, a DP inclui diferentes formas e outros distúrbios neurológicos, tais como a doença de Alzheimer, onde pode coexistir a atrofia de vários sistemas (Ramaker *et al.*, 2002). Pelas razões acima mencionadas, às quais se acresce o facto de, por vezes, os testes de diagnóstico não permitirem estas distinções, esta doença permanece difícil de diagnosticar.

Embora a esperança de vida dos doentes de Parkinson seja curta, esta doença raramente, é por si, só causadora de morte de uma forma direta, pois geralmente a morte é causada por complicações secundárias, como pneumonia ou problemas cardiovasculares (Moussaud, 2011).

1.2.2 Epidemiologia da DP

Os dados epidemiológicos relativos à DP são limitados, visto serem relativos a um período de tempo recente e pelas dificuldades que existem no seu diagnóstico clínico (Rahkonen *et al.*, 2003).

A nível europeu, existem alguns estudos de prevalência da doença, tendo sido o mais recente publicado em 2005, por von Campenhausen e colaboradores. De acordo com este estudo, no qual reuniram 39 estudos anteriores, as estimativas de taxa de prevalência bruta variaram de 66 casos por 100.000 pessoas a 12.500 casos por 100.000 pessoas.

Em Portugal, está a decorrer um estudo epidemiológico de base populacional em território nacional para determinar a prevalência desta doença. Segundo a Associação Portuguesa de Parkinson, estima-se que existam entre 20 a 30 mil doentes de Parkinson em Portugal, podendo o número ser muito superior, uma vez que não há um registo oficial de doentes (www.parkinson.pt). Um estudo de Dias *et al.* (1994) identificou uma prevalência de 130 por 100.000 pessoas; o Observatório Nacional de Saúde, em 2005, apresentou uma prevalência auto-declarada de 392 por 10.000 pessoas (Branco *et al.*, 2005).

Tem-se verificado uma maior incidência em indivíduos do sexo masculino, com um risco de 2% para os homens e 1,3% para as mulheres (Elbaz *et al.*, 2002). A razão homens:mulheres afetados pela doença é de aproximadamente 1,43:1 (Roos *et al.*, 1996). A idade de início da doença varia, segundo alguns estudos, entre 55 e 63 anos (Hoehn e Yahr, 1967; Roos *et al.*, 1996). No caso da doença de Parkinson juvenil, tem início antes dos 21 anos de idade, enquanto a doença com início precoce surge entre os 21 e os 40 anos (Schrag *et al.*, 1998).

1.2.3 Patologia da DP

Os principais sintomas parkinsonianos estão diretamente relacionados com a degenerescência anormal dos neurónios dopaminérgicos, localizados no mesencéfalo, mais especificamente na substância *nigra* (Jakobsen e Jensen, 2003). Estes neurónios dopaminérgicos projetam os seus axónios para o corpo estriado, formando assim a via dopaminérgica nigro-estriatal. Esta via encontra-se subdividida nas vias direta e indireta. No conjunto, formam uma espécie de equilíbrio, crucial no controlo dos movimentos. A degenerescência dos neurónios dopaminérgicos da substância *nigra* induz uma redução da estimulação da dopamina do estriado, que leva a um aumento de excitação da via indireta, aumentando, por outro lado, a inibição da via direta. Este desequilíbrio tem como consequência uma inibição aumentada do núcleo ventral anterior do tálamo e uma excitação diminuída do córtex motor (Moussaud, 2011).

A DP é caracterizada por uma fase assintomática bastante prolongada. Efetivamente, quando o tremor surge, já se perderam mais de metade dos neurónios dopaminérgicos da substância *nigra*. No entanto, esta não é a única área afetada por esta doença. Nas fases iniciais da doença, os bolbos olfatórios e a parte inferior do tronco encefálico são as primeiras regiões afetadas, seguidas do prosencéfalo basal e do hipocampo. Nas fases mais avançadas, quase todas as regiões podem aparecer afetadas (Braak *et al.*, 2003; Braak *et al.*, 2004).

1.2.3.1 A alfa-sinucleína na doença de Parkinson

Os agregados de alfa-sinucleína no cérebro são uma característica molecular das sinucleinopatias, nomeadamente da doença de Parkinson. A alfa-sinucleína ou *non-A-beta component of AD amyloid* (NACP) é uma proteína constituída por 140 aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 14 kDa, que se encontra nos terminais pré-sinápticos, mas também no núcleo, tendo sido mais recentemente detetada na mitocôndria (Yu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). O gene que codifica para a proteína, denominado por *SNCA* ou *PARK1*, localiza-se no braço longo do

cromossoma 4 (4q21) e consiste em sete exões, cinco dos quais codificam para a proteína (Spillantini *et al.*, 1995).

Do ponto de vista estrutural, a alfa-sinucleína é constituída por três domínios principais (Figura 5). A sua extremidade N-terminal é composta por motivos de repetição, que possuem a sequência consenso KTKEGV (Moore *et al.*, 2005). Esta sequência favorece a formação de α -hélices (Davidson *et al.*, 1998). A região central contém o domínio NAC (*non amyloid component*) que está envolvido na agregação da proteína. Por último, o domínio C-terminal contém um motivo de fixação aos ácidos gordos (Sharon *et al.*, 2001).

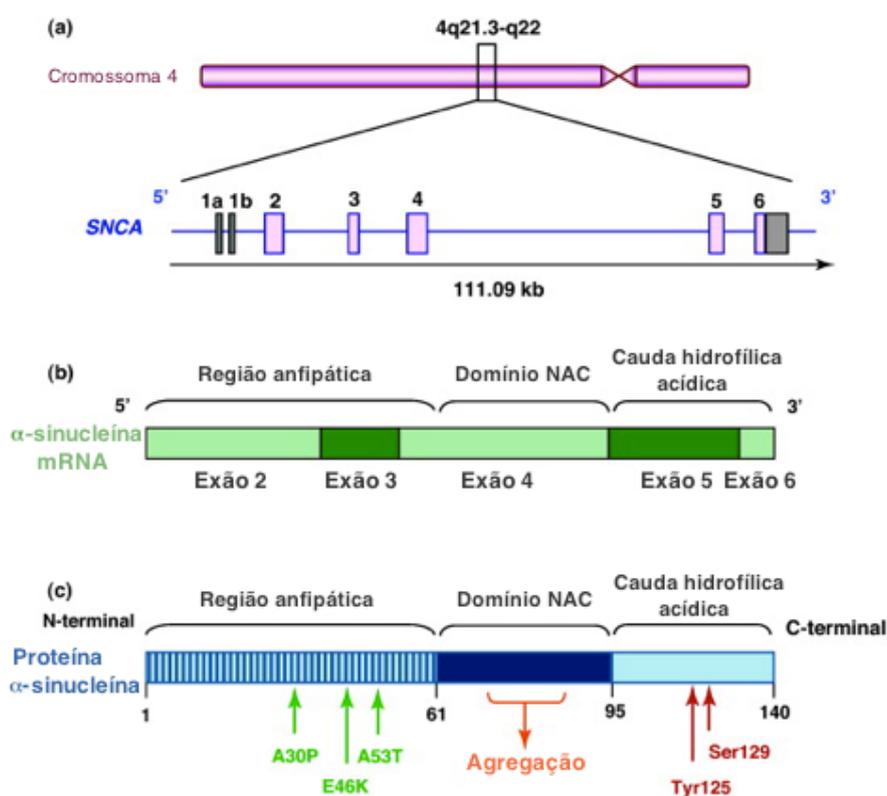


Figura 5. Representação esquemática da alfa-sinucleína humana: (a) estrutura do gene *SNCA*, (b) mRNA, e (c) domínios da proteína: (adaptado de Venda *et al.*, 2010).

Existem três variantes que resultam do *splicing* alternativo do gene: a forma *full length* da alfa-sinucleína, que codifica a proteína completa, constituída por 140 aminoácidos e que é expressa principalmente no cérebro, nomeadamente no hipocampo, neocórtex, estriado, tálamo e cerebelo (Iwai *et al.*, 1995); a variante da alfa-sinucleína com 126 aminoácidos, que não possui

o exão 3; e, por fim, a variante da alfa-sinucleína com 112 aminoácidos, na qual está ausente o exão 5 (Xia *et al.*, 1998).

A alfa-sinucleína pertence a uma família de proteínas de forma nativa “desenrolada” (*unfolded*) e não apresenta uma estrutura secundária específica (que depende do ambiente que a rodeia) (Davidson *et al.*, 1998; Perrin *et al.*, 2000). Nas sinucleinopatias, a alfa-sinucleína pode sofrer uma alteração conformacional, passando de uma estrutura inicial aleatória a uma estrutura em folhas β . A formação destas estruturas parece favorecer a agregação e a formação de fibrilhas semelhantes a filamentos observados nos corpos de Lewy, característicos de algumas demências e da DP (Giasson, *et al.*, 1999; Serpell, *et al.*, 2000).

No que diz respeito a mutações no gene, foram publicadas três mutações pontuais (A30P, A53T e E46K), associadas a algumas formas familiares de doença, pensando-se que estas mutações podem acelerar a formação de fibrilhas de alfa-sinucleína (Perrin, *et al.*, 2001; Greenbaum, *et al.*, 2005). Para além dessas mutações pontuais, a duplicação e triplicação do gene *SNCA* podem também estar na origem de algumas formas familiares da doença de Parkinson (Singleton, *et al.*, 2003; Ibanez, *et al.*, 2004). Mais especificamente, a triplicação desse gene é responsável por duplicar a expressão da alfa-sinucleína no cérebro, estando esta principalmente associada à forma hereditária que leva ao aparecimento da DP em idades precoces. A forma da DP com duplicação genómica assemelha-se à forma idiopática, que parece surgir mais tardiamente na vida dos doentes e, desta forma, levar a maior longevidade (Nishioka *et al.*, 2006; Perfeito e Rego, 2011).

Relativamente às funções que a alfa-sinucleína possa ter, ainda não são claramente conhecidas, supondo-se que possa ter um papel nos terminais nervosos pré-sinápticos, relacionado com processos associados a membranas (Iwai *et al.*, 1995; George, 2001). Existem diversos estudos a sugerirem que a alfa-sinucleína funciona como uma proteína *chaperone*, devido à sua estrutura bioquímica, com capacidade para se ligar a outras proteínas intracelulares, pois possui homologia com regiões da família das *chaperones* 14-3-3 (Tzivion *et al.*, 1998; Ostrerova *et al.*, 1999). Ainda no que toca à hipótese das *chaperones*, a alfa-sinucleína parece interagir nos

terminais sinápticos com várias proteínas que regulam a homeostase da dopamina nos neurónios dopaminérgicos nigroestriatais (Perfeito e Rego, 2011). Neste aspeto, sabe-se que a alfa-sinucleína regula a actividade catalítica da tirosina hidroxilase, a principal enzima envolvida na síntese de dopamina. A proteína parece desempenhar um papel importantíssimo no que toca à fosforilação da enzima tirosina hidroxilase e, portanto, na síntese da dopamina nos neurónios dopaminérgicos (Perez *et al*, 2002; Drolet *et al*, 2005).

Até ao momento, foram já descritos alguns fatores que parecem acelerar/facilitar a agregação da alfa-sinucleína e a formação de fibrilhas como, por exemplo, mutações na proteína ou stress oxidativo. Efetivamente, as formas mutantes desta proteína formam fibrilhas mais rapidamente do que a sua forma nativa em solução aquosa (Greenbaum *et al.*, 2005). De entre as mutações A30P e A53T, pensa-se que a alfa-sinucleína A53T possua taxas de agregação mais elevadas quando em comparação com a outra mutação (Conway *et al.*, 1998). Além do mais, a mutação A53T causa stress a nível do retículo endoplasmático, parecendo contribuir para uma disfunção no armazenamento da dopamina em vesículas e promovendo o stress oxidativo e alterações na função metabólica (Lotharius *et al.*, 2002). Ainda no que diz respeito a esta mutação, parece existir um defeito na ligação desta forma mutante às membranas lipídicas, considerando-se ser um dos passos iniciais que conduzem à sua agregação e incorporação em filamentos (Fortin *et al.*, 2004; Perfeito e Rego, 2011). Quanto ao stress oxidativo, o aumento de radicais livres pode estar na origem da quebra da estrutura em hélice alfa e levar a conformações patogénicas da proteína (Souza *et al.*, 2000).

1.2.4 Genética da DP

Apesar de ainda não serem conhecidos os processos exatos de degenerescência dos neurónios dopaminérgicos, sabe-se que, para cerca de 5% dos casos, a DP é hereditária, tendo já sido identificadas mutações genéticas em determinados genes que codificam proteínas associadas à doença. Assim, mutações nos genes *alfa-sinucleína*, *UCH-L1*, *HTRA2* e

LRRK2 estão relacionadas com a doença na forma autossômica dominante, enquanto que nos genes *Parkin*, *PINK1*, *DJ1* e *ATP13A2* induzem a doença na forma autossômica recessiva. No entanto, a DP hereditária apresenta algumas diferenças em relação à DP esporádica, uma vez que as formas familiares têm uma idade de início mais precoce e os sintomas e resposta aos tratamentos também diferem (Vila *et al.*, 2008).

No caso da DP não familiar, isto é, os restantes 95% dos casos, as causas e processos envolvidos na doença ainda não são claramente conhecidos. Pensa-se que existem diversos fatores que podem influenciar a prevalência como, por exemplo, a localização geográfica ou o estilo de vida (Hernan *et al.*, 2002; Goldman *et al.*, 2006).

1.3 A mitocôndria e o DNA mitocondrial

Vários autores demonstraram que as mitocôndrias parecem ter surgido nas células eucarióticas, por endossimbiose de uma célula hospedeira e células procarióticas. A endossimbiose (simbiogénese) é o processo que origina um novo organismo através de uma associação simbiótica estável (Oliveira e Menck, 2001).

As células possuem um número variado de mitocôndrias. Algumas contêm até 10.000 mitocôndrias, como as células do músculo estriado, e outras não contêm nenhuma, como os eritrócitos (Souza, 2005). As mitocôndrias possuem um genoma próprio, o DNA mitocondrial (De Robertis, 2003). Dado que, em média, existem cerca de 1.000 mitocôndrias em cada célula e que cada mitocôndria contém várias cópias (2-10) de DNA mitocondrial, podem existir cerca de 10^3 - 10^4 moléculas de mtDNA idênticas numa única célula, com exceção dos espermatozoides e ovócitos, $\sim 10^2$ e $\sim 10^5$, respectivamente (Satoh e Kuroiwa, 1991; Grazina, 2004).

A mitocôndria (Figura 6) possui um tamanho variável, de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro e 5,0 a 10 μm de comprimento. No que diz respeito à sua função, participam em inúmeros processos e são responsáveis pela respiração celular, sendo consideradas autênticas fábricas de produção de energia, necessária para o bom funcionamento da célula (De Robertis, 2003).

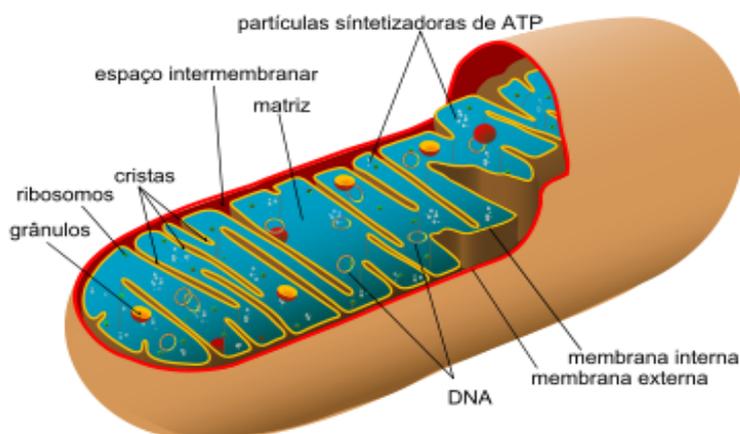


Figura 6. Imagem representativa de uma mitocôndria (adaptado de http://www.acervosaude.com.br/artigo_009_41.html).

A energia necessária para o funcionamento celular é obtida a partir da oxidação dos nutrientes. A oxidação desses “combustíveis” pelo oxigênio liberta uma quantidade importante de energia, que é armazenada pela mitocôndria sob a forma de uma ligação anidrido, na fosforilação de adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP). Os substratos celulares utilizados para produzir ATP são os produtos da glicólise, ácidos gordos, corpos cetônicos e alguns aminoácidos. O conjunto destas reações, que levam à síntese do ATP, consomem oxigênio, constituindo o processo designado por respiração mitocondrial, levada a cabo pela cadeia respiratória mitocondrial (CRM) (Berg *et al*, 2002).

A CRM (Figura 7) é composta por cinco complexos enzimáticos, cujas subunidades são codificadas pelos genomas mitocondrial e nuclear, à exceção do complexo II, inteiramente codificado pelo genoma nuclear. Nesta via de produção de energia, os equivalentes reduzidos de NADH e FADH₂ formados durante o ciclo de Krebs e da β -oxidação entram na cadeia de transporte de eletrões (complexos I-IV do sistema OXPHOS) ao nível do complexo I (NADH: ubiquinona-oxirredutase) ou ao nível do complexo II (succinato desidrogenase). Os eletrões são posteriormente transferidos por um intermediário, a coenzima Q, para o complexo III (ubiquinol: citocromo c oxirredutase ou complexo bc1). Já o segundo intermediário transportador de eletrões, o citocromo c, atua como uma ponte para a transferência de eletrões entre os complexos III e IV (citocromo c oxidase). Depois de os eletrões chegarem ao complexo IV, são transferidos para o oxigênio formando-se água. Durante a transferência de eletrões através da cadeia transportadora de eletrões (complexos I-IV), os eletrões são simultaneamente transferidos da matriz para o espaço intermembranar mitocondrial, pelos complexos I, III e IV. Essa transferência de eletrões cria um gradiente eletroquímico, que é utilizado pelo complexo V (ATPase sintetase) para gerar ATP, ao mesmo tempo que transporta prótons de volta para a matriz (Schagger, 2001).

O mtDNA codifica 13 subunidades da CRM, sendo os restantes codificados pelo DNA nuclear (nDNA). Deste modo, relativamente ao complexo I, o mtDNA codifica 7 subunidades (ND1, -2, -3, -4, -4L, -5, e -6); ao complexo III, de 11 polipéptidos só um (citocromo b) é codificado pelo

mtDNA; o complexo IV, de 13 polipéptidos, três (COI, -II, e -III) são codificados pelo mtDNA; e ao complexo V, de 16 polipéptidos, dois (ATP6 e ATP8) são codificados pelo mtDNA. Dos cinco complexos, apenas os complexos I, III, IV e V transportam prótons, correspondendo a aqueles que possuem subunidades codificadas pelo mtDNA (Wallace *et al.*, 2010).

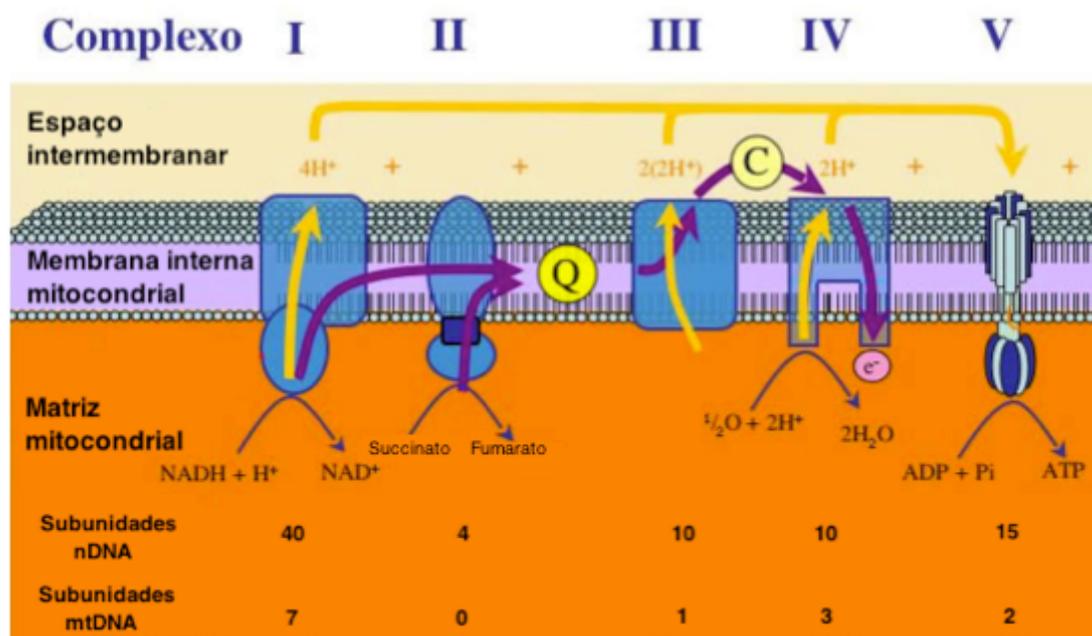


Figura 7. Representação esquemática da fosforilação oxidativa (adaptado de <http://billb.babs.unsw.edu.au/OXPHOS.htm>).

No caso da CRM não estar a desempenhar as suas funções normais, pode ocorrer a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) que, se não forem eficazmente neutralizadas, podem causar danos irreversíveis (Grazina e Oliveira, 2000). De facto, os danos a nível das proteínas mitocondriais e do mtDNA, poderão reduzir a bioenergética mitocondrial e a sua eficiência. O mecanismo na base da produção anormal de ROS pela mitocôndria está relacionado com o potencial redox alterado dos transportadores da CRM e o tempo de meia-vida aumentado da semi-ubiquinona. Isto resulta num transporte de eletrões diminuído, produzindo intermediários que permanecem reduzidos por mais tempo, aumentando, assim, a probabilidade dos eletrões escaparem, e, juntamente com o oxigénio molecular, originar ROS (Sullivan e Brown, 2005).

O DNA mitocondrial difere do DNA nuclear, na medida em que o nDNA forma uma dupla hélice, que codifica aproximadamente 50.000 genes. Já o mtDNA representa 1 a 2% do DNA celular, em duplo filamento circular e codifica 37 genes. O mtDNA codifica aproximadamente 10% das proteínas constitutivas das mitocôndrias e para um bom funcionamento da mitocôndria, é necessário uma boa cooperação entre os dois genomas (Giles *et al*, 1980; Cann *et al*, 1987). No que diz respeito à composição química, as diferenças são menores, mas o mtDNA possui um código genético próprio (Giles *et al*, 1980; Cann *et al*, 1987). Por outro lado, a sequência do mtDNA é codificante quase na sua totalidade, com os genes que codificam os tRNAs e rRNAs distribuídos ao longo de todo o genoma, intercalados nas sequências que codificam os peptídeos da CRM (Grazina, 2004). O mtDNA não possui intrões, o que pode ser uma vantagem, tendo em conta o “empacotamento económico” deste genoma (Attardi, 1985). Por outro lado, pode constituir uma desvantagem, uma vez que o mtDNA é maioritariamente constituído por zonas codificantes. Devido à proximidade do mtDNA com a produção de espécies reativas de oxigénio, o mtDNA pode estar sujeito a maior risco de alteração pois não existindo intrões, irá afetar regiões codificantes muito mais facilmente (Grazina, 2004). A acrescer a este risco, é de notar que o mtDNA é desprovido de histonas e os seus mecanismos de reparação são pouco eficazes (Wallace *et al.*, 2010).

1.3.1 Características particulares do mtDNA

A hereditariedade do mtDNA ocorre por via materna (Giles *et al*, 1980). De facto, apesar de algumas mitocôndrias do espermatozóide penetrarem no óvulo durante o processo de fecundação, elas são posteriormente degradadas (Sutovsky *et al.*, 1999).

O mtDNA é de origem materna e as mitocôndrias no óvulo são separadas ao acaso para as células filhas. De facto, tem sido amplamente observada a coexistência de mtDNA *wild-type* e mutante na mesma célula e tecido - heteroplasmia (Ivanov *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2004).

Deste modo, quando há divisão celular ocorre segregação mitótica e dá-se uma distribuição aleatória das cópias mutadas de mtDNA nas mitocôndrias, nas células e nos tecidos, formando-se “mosaicos” de células com diversas percentagens de cópias mutadas em relação ao número de moléculas de mtDNA normais. Assim pode-se encontrar, desde células com todas as cópias normais (homoplasma normal) a células com todas as moléculas mutadas (homoplasma mutante), passando por vários graus de heteroplasma (Wallace, 1987; Schon, 1994; Schon, 2000; Citado de Grazina, 2004) (Figura 9).

Tal como já foi mencionado, as mutações no mtDNA podem afetar algumas, mas nem todas as moléculas de mtDNA. Com efeito, a expressão clínica da mutação patogénica do mtDNA é determinada, em grande parte, pelas proporções de mtDNA normal e mutante em diferentes tecidos - efeito limiar. Assim, à percentagem de mtDNA mutante que irá causar um defeito bioquímico suficiente para causar um fenótipo clínico específico, denomina-se limiar crítico. Uma grande variedade de autores considera que é necessária uma carga de mutação mínima (acima de 70%) para causar disfunção mitocondrial num órgão ou tecido (DiMauro e Schon, 2008).

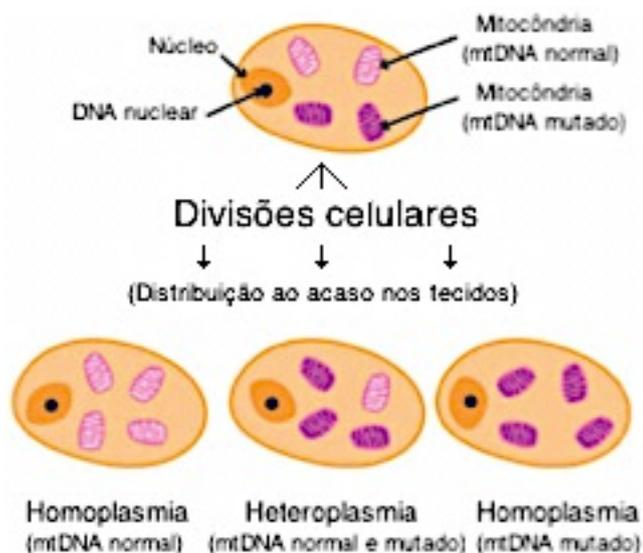


Figura 9. Esquema representativo de heteroplasma vs. homoplasma (adaptado de www.associationfrancaisecontrelesmyopathies.org, 2007).

1.3.2 Complexo I – NADH Desidrogenase e DH e DP

O primeiro complexo enzimático da CRM consiste numa estrutura de 45 subunidades distintas, com um peso molecular total de aproximadamente 980 kDa (Carroll *et al.*, 2003; 2006). É codificado pelos genomas nuclear - subunidades designadas por NDU - e mitocondrial - subunidades denominadas por ND. Para além disso, também é usado um prefixo na designação dos fatores de *assembly* - NDUF_{AF} (NDU de NADH desidrogenase, F de subcomplexo alfa, AF de fator de *assembly*), seguido de um número indicativo da altura em que foi classificado pela primeira vez (Mimaki *et al.*, 2012).

A NADH desidrogenase (Figura 10) é o maior dos complexos da CRM, e o mtDNA codifica 7 das suas subunidades: ND1-ND6 e ND4L (módulo P). No que toca a estas subunidades, pensa-se que estejam envolvidas no transporte de eletrões e na ligação à ubiquinona, de forma semelhante às bactérias (Janssen *et al.*, 2006; Friedrich e Bottcher, 2004). As restantes 38 subunidades são codificadas pelo nDNA e importadas para a mitocôndria (Hoogenraad, 2002; Hirst *et al.*, 2003). Destas, 7 compõem o centro catalítico da enzima, catalizando a oxidação do NADH e a transferência de eletrões (Janssen *et al.*, 2006; Lazarou *et al.*, 2009). Ainda no que diz respeito à sua estrutura, o complexo I apresenta-se na forma de um “L”. A sua porção periférica é constituída por dois módulos: N e Q. De acordo com o que se sabe até ao momento, o módulo N, responsável pela oxidação do NADH, engloba três subunidades nucleares, enquanto o módulo Q, que tem como função a transferência de eletrões para a ubiquinona, engloba pelo menos 4 subunidades nucleares (Vogel *et al.*, 2007).

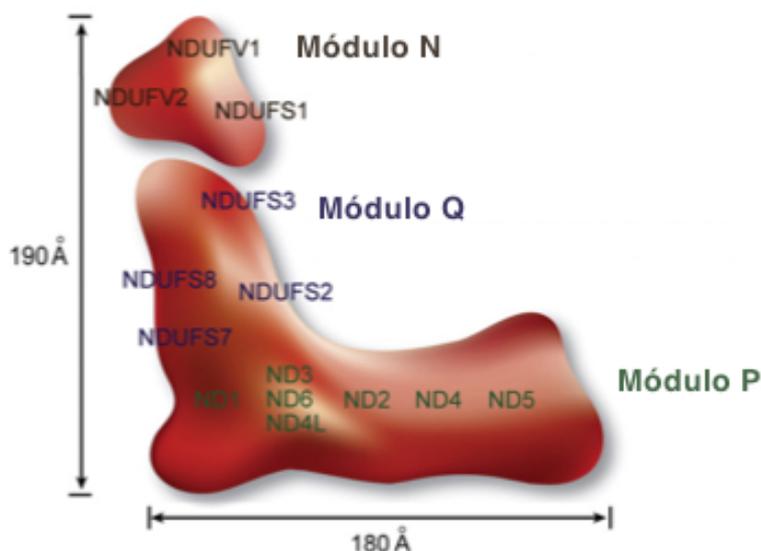


Figura 10. Representação esquemática da estrutura do complexo I mitocondrial de mamíferos (adaptado de Mimaki *et al.*, 2012).

A deficiência do complexo I é uma das alterações mais comuns da CRM em doenças humanas. Possui uma ampla variedade de apresentações clínicas, que vão desde doenças mitocondriais infantis letais, a doenças neurodegenerativas da fase adulta, e podem ser causadas por mutações no mtDNA ou nDNA (Robinson *et al.*, 1987; Kirby *et al.*, 1999; Skladal *et al.*, 2003; Distelmaier *et al.*, 2009). Foram descritos deficiências no complexo I causadas por vários defeitos genéticos, em diferentes subunidades, incluindo as subunidades codificadas pelo mtDNA. Além do mais, vários autores debruçaram-se sobre o estudo da relação destas mutações com os fatores de *assembly* deste complexo, revelando defeitos neste processo. Mutações nos genes *MT-ND1* e *MT-ND6* causam deficiência grave no processo de *assembly*, o que irá condicionar a integração das subunidades no complexo (Hofhaus e Attardi, 1993; Ugalde *et al.*, 2003; Kirby *et al.*, 2004). Contudo, é necessário não esquecer que os efeitos das mutações no mtDNA, incluindo as que afetam este complexo, também dependem da proporção de mtDNA mutante e da mutação que irá afetar a função normal da proteína (Mimaki *et al.*, 2012).

No que diz respeito ao complexo I em doentes de Huntington, podem existir alterações no mtDNA causadas pela mtHtt, incluindo deleções. Já

foram identificadas alterações em cérebros de doentes de DH, assim como nos tecidos periféricos, tem sido sugerido que levam a uma estrutura mitocondrial alterada (Banoei *et al.*, 2007). Estes processos parecem estar relacionados com a idade (Acevedo-Torres *et al.*, 2009). Num estudo envolvendo ratos, como modelo animal, foi encontrada uma redução nos níveis de mRNA de duas das subunidades mitocondriais do complexo I - ND4 e ND6. Assim, considerou-se que os danos no mtDNA poderiam ser um bom marcador da neurodegenerescência associada à DH (Acevedo-Torres *et al.*, 2009), apesar de alguns estudos parecerem contraditórios e, portanto, deste aspeto não estar completamente esclarecido.

Já no que toca à DP, pensa-se que a perda de atividade deste complexo contribua para a perda de função celular observada na doença, pois vários estudos demonstraram que a inibição da enzima causa DP quer em ratos, quer em humanos (Nicklas *et al.*, 1985; Betarbet *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002). De facto, a atividade da NADH desidrogenase está reduzida em diferentes tecidos, como plaquetas, músculo ou cérebro (substância *nigra*) (Yoshino *et al.*, 1992; Cardellach *et al.*, 1993; Parks *et al.*, 1999). Segundo Schapira, observa-se uma redução de cerca de 35% da atividade do complexo I em doentes de Parkinson (Schapira, 2000). Ainda de acordo com o estudo de Smigrodzki *et al* (2004) foi referido um elevado número de mutações no gene *ND5*, em doentes de Parkinson, em comparação com controlos. Além disso, foram detetadas várias alterações de aminoácidos associados às mutações do mtDNA, em cérebros de doentes de DP, mas não em cérebros controlo.

1.3.3 A disfunção mitocondrial nas doenças de Huntington e Parkinson

Cada vez mais se tem evidenciado o papel da disfunção mitocondrial e da bioenergética na DH. Para além das mutações nos complexos, anteriormente referidas, existem outros fatores relacionados com a mitocôndria a mencionar. Estudos em ratos, modelos de DH, revelaram uma redução na atividade dos complexos I-IV da CRM. Estes resultados são consistentes com estudos em neurónios estriatais humanos de DH, que

mostraram uma redução na atividade dos complexos II, III e IV (Browne *et al.*, 1997; Fukui e Moraes, 2007; Pandey *et al.*, 2008). O tráfego mitocondrial também tem grande destaque na doença, com grande influência da mtHtt, que parece comprometer o tráfego de diferentes formas. Efetivamente, na sua forma nativa, a Htt interfere com vários mediadores do transporte mitocondrial nos neurónios. Diversos trabalhos mostraram que a agregação mediada pela mtHtt sequestra a Htt e componentes da maquinaria de transporte, prejudicando o tráfego mitocondrial (Trushina *et al.*, 2004). Por outro lado, a mtHtt pode atuar como blocos físicos a nível neuronal e, assim, impedir a passagem das mitocôndrias nos processos neuronais, comprometendo as funções neuronais normais (Chang *et al.*, 2006). O transporte de cálcio ao nível da mitocôndria é outra possível causa a acrescentar na DH, já que existem estudos a comprovar que este transporte se encontra alterado. Foi descrito que células que expressam mtHtt aparentam ter um *uptake* reduzido de cálcio, alterando o potencial membranar. No conjunto, os dados de estudos distintos sugerem que a mtHtt a entrada excessiva induz Ca^{2+} nos neurónios de DH, na mitocôndria, induzindo a abertura do mPTP, levando à alteração de potencial membranar e decréscimo do ATP, que, por fim, conduz à atrofia cerebral (Reddy *et al.*, 2009).

A disfunção mitocondrial também está implicada na DP. Tal como já foi referido, uma das causas da DP autossómica dominante são as mutações no gene da alfa-sinucleína. A inibição do complexo I, também já mencionada na DP, promove a agregação da alfa-sinucleína em culturas celulares e em modelos animais da doença (Lee *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2003). Mas também outros genes implicados na DP se localizam na mitocôndria e/ou influenciam a fisiologia mitocondrial, caso das proteínas Parkin, DJ1, PINK1 e LRRK2. De facto, é conhecido que um decréscimo no potencial da membrana mitocondrial, resultante de um comprometimento da fosforilação oxidativa ou excesso de ROS, pode funcionar como sinal para a proteína Parkin ser translocada do citosol para a mitocôndria. Neste sentido, alguns estudos têm evidenciado que esta translocação possa ser promovida pela fosforilação desta proteína pela PINK1. Como consequência desta

translocação, é promovida a fissão das mitocôndrias e a sua degradação por mitofagia (Gegg *et al.*, 2011).

II – Objetivos

A DH pode, de facto, estar relacionada com uma ampla variedade de mecanismos patológicos, havendo destaque para a mitocôndria, nomeadamente no que toca a stress oxidativo, comprometimento no transporte de cálcio, disfunção metabólica, entre outros já mencionados. Para produzir cíbridos torna-se, em primeiro lugar, necessário obter as chamadas células Rho-0, pelo que é essencial a confirmação de uma depleção total de mtDNA nestas células.

Também na DP existem evidências de uma correlação com a mitocôndria. Tem-se verificado e reconhecido um papel da alfa-sinucleína nesta doença, assim como uma relação com a mitocôndria na DP. Com a finalidade de tentar compreender uma possível relação entre o mtDNA e a expressão desta proteína, recorreu-se a um sistema *Tet-off*, do qual resulta uma expressão normal ou sobre-expressão da alfa-sinucleína.

Deste modo, neste trabalho pretendeu-se:

- Quantificar o número de cópias de mtDNA, em células Rho-0 derivadas de controlos e de um doente de Huntington;
- Quantificar o número de cópias mtDNA em células de modelo da DP que expressavam a alfa-sinucleína nas condições +Dox e -Dox;
- Sequenciar o mtDNA de células com expressão da proteína referida, em particular, dos genes mitocondriais *MT-ND*.

III – Material e Métodos

3.1 Amostras biológicas

As células em cultura utilizadas para análise do mtDNA neste trabalho foram preparadas previamente no âmbito de uma outra tese de Mestrado (Joana Rodrigues) para outros estudos. Relativamente às células de modelo da DP, foram preparadas anteriormente, num trabalho inserido numa tese de Doutoramento (Rita Perfeito) para outros estudos.

3.1.1 Células Rho-0

A preparação de células Rho-0 teve como intuito estabelecer um modelo para estudos posteriores relacionados com a investigação dos mecanismos envolvidos na doença de Huntington.

A cultura foi mantida a 37°C, numa atmosfera com 95% de ar, 5% de CO₂. O meio usado foi RPMI, suplementado com 15% de FBS não ativado, 2mM de glutamina, 50 µg/mL de estreptomicina e 100 IU/mL de penicilina. Para a produção das células Rho-0 o meio foi suplementado com 100 µg/mL de piruvato de sódio e 100 µg/mL de uridina. As células foram colocadas em placas a uma densidade de 0,3 x10⁶ células/mL. Cada amostra foi colocada em frascos com 5mL de suspensão celular. A cada frasco foi adicionado brometo de etídeo (BrEt) numa concentração final de 0, 50 ou 75 ng/mL. As células cresceram em suspensão nestas condições, formando agregados. O meio foi mudado a cada três ou quatro dias e repostado com novo meio Rho-0 (com a respetiva concentração de BrEt). Quando atingida a densidade celular desejada, as células foram transferidas para novos frascos. Este procedimento foi realizado em dois ensaios independentes, pelo que a metodologia deste estudo foi realizada também em duplicado, para as condições mencionadas.

Tabela 2. Caracterização das amostras das linhas celulares de linfoblastos.

Amostra	Género	Idade de início	Idade	Expansões de CAG	Nº passagens
Doente	Masculino	48	58	42/18	18
Controlo 1	Masculino	-	42	-	15
Controlo 2	Feminino	-	45	-	15

Deste modo, após extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, foi realizada a quantificação do número de cópias de mtDNA, através de PCR em tempo real, para as concentrações de BrEt referidas, para os controlos e para o doente, conforme será descrito em seguida.

3.1.2 Modelo celular de doença de Parkinson

No que diz respeito às amostras relativas à DP, utilizaram-se células de neuroblastoma humanas (SH-SY5Y), modificadas para expressarem de forma regulada a alfa-sinucleína e, desta forma, poderem mimetizar um modelo celular de Parkinson. Pensa-se que a sobre-expressão da proteína possa ser tóxica, tendo sido criado um modelo induzido por tetraciclina (análogo da doxiciclina), - dox, no qual, retirando dox ao meio, é ativada a expressão do gene da alfa-sinucleína – sistema designado por *Tet-off*. Em condições normais (controlo) as células são mantidas em meio com dox, para que a expressão do gene esteja inibida e se mantenham apenas os níveis endógenos. Os sistemas *Tet-off* envolvem a co-transfecção de dois vetores (o ativador e o repressor) que são regulados por Dox e, dependendo se são *On* ou *Off*, “ligam” ou “desligam” a ativação dos genes. Em relação às condições de manutenção, as células cresceram a 37°C, em meio RPMI 1640 com 10% de FBS, L-Glutamina (2 mM) e 1% Pen/Strep. O meio de cultura tem de conter sempre higromicina B (50 ug/ml) e G418 (250 ug/ml), que são os antibióticos de seleção. Para além disso, a dox esteve presente no meio à

concentração de 2 ug/ml e foi renovada de 2 em 2 dias. A expressão máxima de alfa-sinucleína foi obtida ao fim de 4-6 dias sem Dox.

Desta forma, foram usadas células nas condições +Dox e -Dox, correspondendo a uma expressão normal da proteína (gene inativo) ou a uma sobre-expressão da proteína (gene ativo).

Assim, após extração pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico destas amostras, foi realizada a quantificação do número de cópias de mtDNA, através de PCR em tempo real e sequenciados os sete genes mitocondriais *MT-ND* por sequenciação automática.

3.2 Extração de DNA

A extração e a purificação de ácidos nucleicos a partir de diversas amostras experimentais (bactérias, fungos, tecidos vegetais e animais) é uma etapa fundamental para garantir eficiência na amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR).

O método mais utilizado para purificação do DNA é a extração com fenol-clorofórmio, onde se aplicam agentes químicos que provocam a desnaturação das proteínas contidas na amostra de modo eficiente. A proteinase K, juntamente com a solução de proteinase K, promovem a desnaturação das proteínas e de outras estruturas celulares, de modo a expôr o DNA. A ação do fenol/clorofórmio baseia-se nas propriedades hidrófobas das proteínas, que apresentam afinidade por solventes orgânicos. No que diz respeito à precipitação do DNA, o etanol induz a transição estrutural nas moléculas de ácidos, fazendo-as agregarem-se (formando uma medusa), com conseqüente precipitação. Para além de concentrar o DNA, a precipitação com etanol absoluto ajuda a remover sais e resíduos de solventes orgânicos presentes na amostra.

As amostras de células (3.1.1 e 3.1.2) foram submetidas a extração. O processo foi iniciado com adição de proteinase K e solução de proteinase K para solubilizar as proteínas, e, de seguida, incubou-se *overnight*. No dia seguinte, adicionou-se fenol, procedeu-se a centrifugação e retirou-se a fase orgânica. Precipitou-se a fase aquosa (que contém o DNA) com etanol

absoluto e o sobrenadante foi desprezado, deixou-se secar e ressuspendeu-se em TE (Tris EDTA), colocou-se a 4°C até à completa solubilização do DNA.

3.3 Quantificação de DNA

Os ácidos nucleicos absorvem luz Ultravioleta (UV) num comprimento de onda de 250 até 280 nm com um máximo de 260 nm. A quantificação do DNA foi efetuada num equipamento de leitura de absorvância, *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, EUA), através da medição da absorvância a diferentes comprimentos de onda (Sambrook *et al.*, 1989). Para cada uma das amostras foram efetuadas duas leituras no equipamento: uma a 260 nm, que permite quantificar o DNA, e outra a 280 nm, pois a razão $A(260)/A(280)$ permite estimar a sua pureza.

Para efetuar estas leituras, usaram-se 2 µL da amostra, calibrando o aparelho com o branco, que consistiu em água (2 µL). A fórmula $[DNA] = DO_{260} \times 0,05 \times \text{fator}_{\text{diluição}} (\mu\text{g}/\mu\text{L})$ foi usada para efetuar a quantificação do DNA.

3.4 PCR em tempo real quantitativo (qPCR-RT)

A PCR em tempo real é utilizada com diversas finalidades, nomeadamente para a quantificação de ácidos nucleicos e para genotipagem. Desde a sua descrição, em 1996, o número de publicações com a utilização desta técnica tem vindo a crescer de uma forma notável. O seu fundamento relaciona-se com o facto do processo de amplificação ser monitorizado em tempo real, através da utilização de fluorescência. Assim, são usadas sondas de hibridização marcadas com fluorocromos, em termocicladores de “tempo real”, que acumulam duas funções, a de termocicladores e a de medidores de fluorescência. São monitorizadas, em “tempo real”, modificações nas características da fluorescência das sondas que se ligam aos produtos da PCR de sequências alvo, durante a amplificação (Dorak, 2006). A possibilidade de monitorizar, ao longo da reação, a quantidade de produto formado a cada ciclo e de quantificar este produto durante a sua fase exponencial de formação, confere mais precisão e reprodutibilidade à

PCR em tempo real em comparação com a PCR convencional.

Uma das possíveis abordagens para a análise dos resultados obtidos, utilizando este método, é a análise das curvas de fusão ou de *melting*, isto é, as sequências amplificadas podem ser caracterizadas em função da sua temperatura de *melting*. Estas representam a temperatura dependente da fluorescência e são função do tamanho e composição em bases do produto amplificado. No presente estudo, a sua deteção foi efetuada utilizando um fluoróforo específico para DNA de cadeia dupla (dsDNA), o SYBR[®] Green (Dorak, 2006). Este reagente consiste em moléculas *DNA-binding dye* que se incorporam nas cadeias duplas de DNA, formadas durante a reação de PCR, emitindo fluorescência proporcional à quantidade de produto sintetizado (Giulietti *et al.*, 2001; Sherrill *et al.*, 2004) (Figura 11).

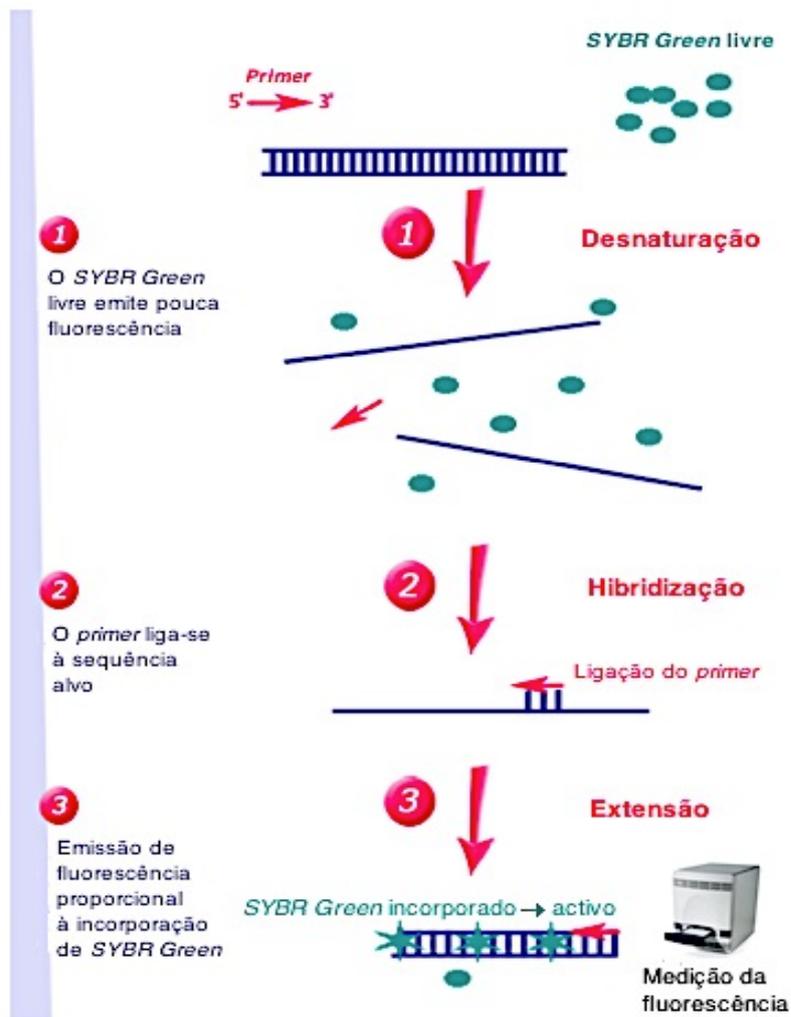


Figura 11. Representação esquemática da amplificação de DNA com SYBR Green, por PCR em tempo real (adaptado de <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>).

A fluorescência é detetada por um sistema óptico e analisada pelo *software* do aparelho à medida que o produto é amplificado, e o gráfico típico resultante encontra-se representado na Figura 12. Esta metodologia permite monitorizar o momento da reação em que a quantidade de fluorescência ultrapassa um limiar definido, conhecido como C_t (*cycle threshold*). A quantificação relativa de produto amplificado realiza-se através da diferença entre estes valores de C_t para a amostra alvo e para o controlo endógeno (Arya *et al.*, 2005).

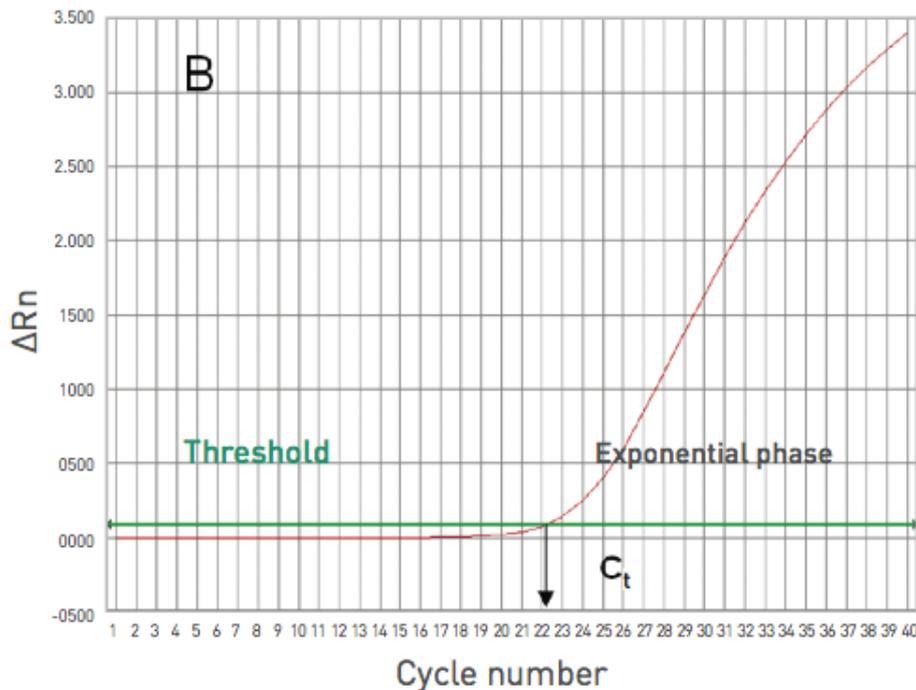


Figura 12. Curva de amplificação de qPCR-RT. Legenda: ΔRn – Emissão de fluorescência do produto em cada momento; C_t – *Cycle threshold* (adaptado de <http://www3.appliedbiosystems.com/>).

No presente trabalho, utilizou-se esta técnica com o objetivo de quantificar o número de cópias do mtDNA nas amostras, recorrendo ao aparelho *7500 Fast-Real Time PCR system* (Applied Biosystems, CA). Conforme mencionado anteriormente, utilizou-se *SYBR[®] Green* (Bio-Rad, CA), e foram amplificados os genes *Microglobulina-2- β* ($\beta 2M$) (nuclear, de cópia única) e *tRNA leucine 1* (gene mitocondrial), com *primers* específicos (Bai e Wong, 2005) (Tabela 3). No que diz

respeito às condições de PCR, aplicou-se um programa de 30 a 35 ciclos de três temperaturas (95°C; ~60°C; 72°C). A medição do número de cópias foi realizada duas vezes para todas as amostras, em triplicado, perfazendo um n=12.

A análise dos resultados foi realizada com o *software 7500[®] V.2.0.4* e a quantificação relativa do número de cópias da amostra alvo foi obtida através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$, com $\Delta Ct = (Ct \text{ alvo} - Ct \text{ controlo})$.

No procedimento desta técnica foi preparada uma *mix* contendo *primer forward* (F) e *reverse* (R) (10 µM) e *SYBR Green*.

3.5 Amplificação dos sete genes *MT-ND* no modelo de DP

Foi em 1983 que Kary Mullis descobriu a técnica de reação em cadeia da polimerase, tendo recebido o prémio Nobel de química, em 1993, pela sua criação (Mullis *et al.*, 1986). Esta técnica revolucionou a genética e a biologia molecular e tem acelerado a taxa de progresso de estudo de genes e genomas. Tem trazido também um enorme avanço no que diz respeito ao diagnóstico de doenças, medicina forense, entre outras áreas (Ma *et al.*, 2006).

O fundamento desta técnica baseia-se nos princípios da replicação do DNA, simulada na técnica de PCR, que utiliza os princípios da replicação natural para obter uma grande quantidade de cópias de fragmentos de DNA. A replicação do DNA é denominada de “semi-conservativa” pois durante a formação de uma nova cadeia nucleotídica tem-se como referência uma única cadeia nucleotídica molde do DNA que está a ser replicada. Para que o processo de replicação se inicie, é necessário a atuação da enzima DNA helicase, que se liga à cadeia de DNA e desliza sobre ela, quebrando as ligações entre as duas cadeias (pontes de hidrogénio), separando-as. Em seguida, após a ligação de *primers* às cadeias simples de DNA, dá-se o início da replicação, através da DNA polimerase, a partir de uma extremidade 3'OH livre. Os nucleotídeos livres vão ligar-se, por complementaridade de bases, às cadeias de DNA, mediante a ação da DNA polimerase, que polimeriza a partir da origem de replicação. A partir de uma cadeia original de DNA formam-se assim duas novas cadeias (Videira, 2001).

A PCR traduz-se então na repetição cíclica de três reações simples, que variam na temperatura de incubação. Desta forma, são necessários os seguintes componentes numa técnica de PCR: DNA polimerase; desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, e dTTP); dois *primers* que delimitam a sequência alvo a amplificar, denominados de *primer forward* e *primer reverse*; solução tampão, que fornece as condições de pH e salinidade para que ocorra síntese; íons Mg^{2+} (cofatores necessários à atividade da *Taq* polimerase) e o DNA alvo que inclua a sequência a amplificar (Guo *et al.*, 2008; Strachan e Read, 2002). O primeiro passo – desnaturação – consiste na desnaturação do DNA a temperaturas elevadas, com vista a obter duas cadeias simples de DNA. De seguida, o segundo passo é realizado a temperaturas mais baixas, e consiste na ligação dos oligonucleótidos (*primers*) de forma a que fiquem a delimitar a zona que se quer amplificar. Esta fase é denominada de *annealing*. Os dois *primers* não devem ser complementares entre si, de modo a não emparelharem entre si, e os seus locais de hibridação não devem ser muito próximos, de modo a que seja possível a síntese de novos produtos (Videira, 2001). Por fim, o terceiro passo – extensão – inclui a síntese de DNA pela *Taq* polimerase, que faz o alongamento dos *primers*, usando como molde a cadeia com que cada *primer* está emparelhado (Buitrago e Jimenez, 2001) (Figura 13).

Os ciclos de desnaturação (95°C), *annealing* (temperatura dependente dos *primers*) e extensão (72°C) são assim repetidos várias vezes no termociclador, sem intervenção manual. Só ao fim do terceiro ciclo de PCR se obtêm moléculas de DNA em cadeia dupla cujas extremidades são definidas pelas extremidades 5' dos *primers* utilizados. Durante cada ciclo de PCR posterior, estas moléculas são duplicadas levando a um crescimento exponencial do fragmento alvo. Cada n ciclos leva à produção de 2^n moléculas de DNA (Strachan e Read, 2002).

Neste estudo, esta técnica foi utilizada com o objetivo de amplificar os sete genes mitocondriais codificantes para o complexo I, *MT-ND*. As posições destes genes no mtDNA encontram-se descritas na Tabela 4.

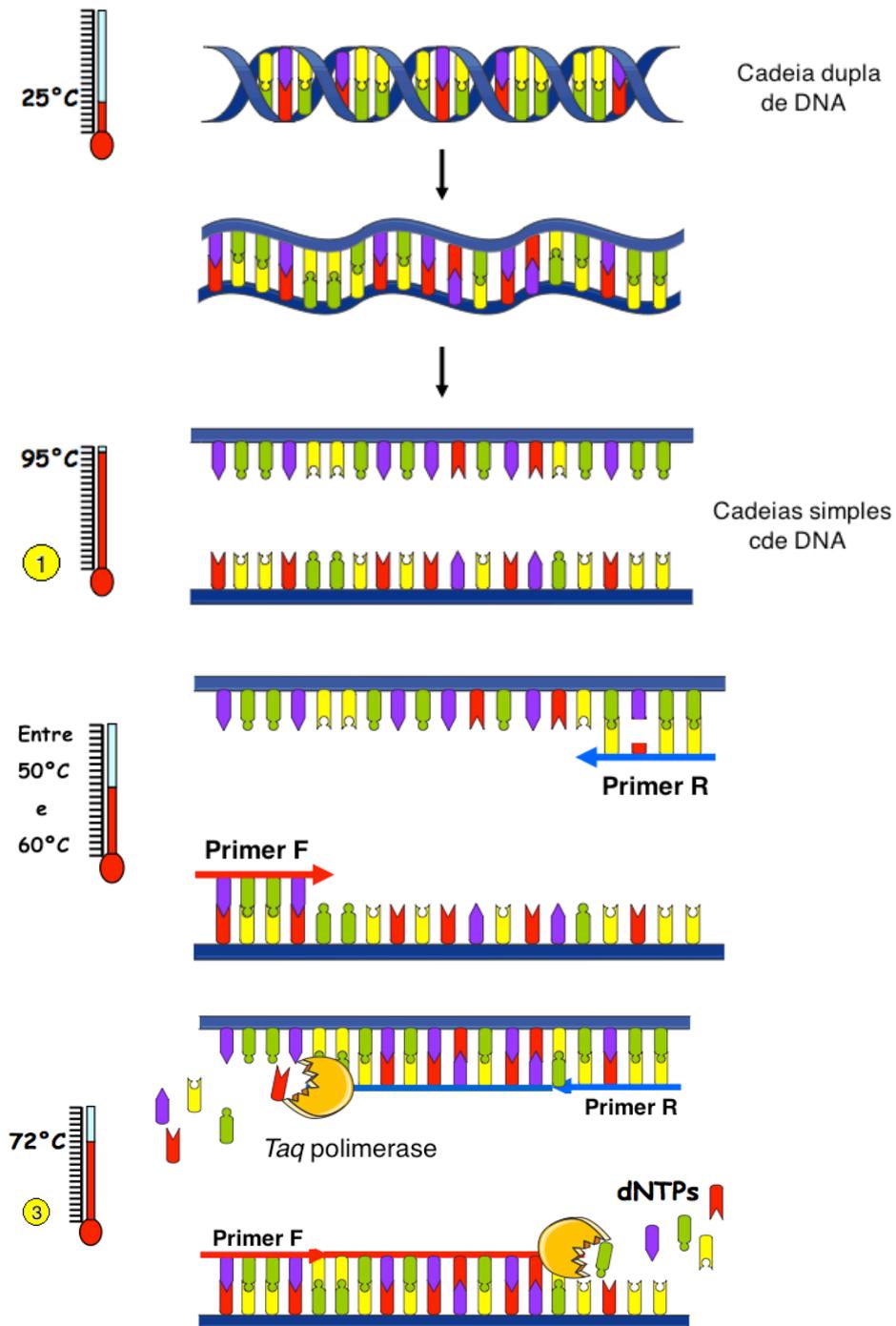


Figura 13. Representação esquemática das etapas da PCR (adaptado de <http://www-ed-sdvs.u-strasbg.fr/openlab>).

Tabela 3. Localização dos genes *MT-ND* no genoma mitocondrial humano (Adaptado de: MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2011).

Map locus	Início	Fim	Descrição
<i>MT-ND1</i>	3307	4262	NADH Desidrogenase subunitdade 1
<i>MT-ND2</i>	4470	5511	NADH Desidrogenase subunitdade 2
<i>MT-ND3</i>	10059	10404	NADH Desidrogenase subunitdade 3
<i>MT-ND4L</i>	10470	10766	NADH Desidrogenase subunitdade 4L
<i>MT-ND4</i>	10760	12137	NADH Desidrogenase subunitdade 4
<i>MT-ND5</i>	12337	14148	NADH Desidrogenase subunitdade 5
<i>MT-ND6</i>	14149	14673	NADH Desidrogenase subunitdade 6

No procedimento seguido no presente trabalho, foi utilizado uma mistura de reação contendo um volume total de 25 μ L. A mistura de PCR incluiu H_2O MilliQ, *primers* forward e reverse (2,5 μ M), DNA (1ng/ μ L), dNTPs (2 mM), *taq* DNA polimerase (Fermentas) e respetivo tampão (1x) $MgCl_2$. Foi usado um controlo negativo (contendo água em vez de DNA) para todas as reacções de PCR.

A sequência dos *primers* utilizados no estudo encontra-se apresentada na tabela abaixo:

Tabela 4. Características dos *primers* utilizados neste estudo (Landsverk *et al*, 2012).

Primer	Sequência (5' para 3')	Tamanho do produto (pb)
F	AACTTTACAGTCAGAGGTTTC	817
R	ACAAAATATGTTGTGTAGAGTTTC	
F	CCCTCACCCTACAATCTT	808
R	ACCTCTGGGACTCAGAAGT	
F	ACTCTCCGGACAATGAAC	922
R	GATTTGCGTTTCAGTTGATG	
F	ACACATCCGTATTACTCGCA	808
R	TATACCAATTCGGTTCAGTCT	
F	ATCATCATCCTAGCCCTAAG	809
R	CCAAGGTGGGGATAAGTG	
F	TCTACCTCTCTATACTAATCTC	718
R	TTTGAGTTTGCTAGGCAGAAT	
F	ATCGCTCATTGCATACTCTTC	752
R	GGTTATAGTAGTGTGCATGG	
F	ACTCATGCCTCCATGTCTA	789
R	GGGTGGAGACCTAATTGGG	
F	AACGCTAATCCAAGCCTC	812
R	TGCGGGGGAAATGTTGTTAG	
F	CACCCTTACTAACATTAACGAA	854
R	TAATTTATTTAGGGGGAATGATG	
F	AGGATACTCCTCAATAGCC	799
R	TTCATTGAACTAGGTCTGTCC	

Legenda: F- *forward*; R- *reverse*

Foi usado um programa de PCR com 35 ciclos (95°C, 45''; 50-60°C, 45''; 72°C, 1').

3.6 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese é uma técnica bioquímica padrão para separar moléculas de acordo com o seu peso molecular e carga elétrica. Permite a separação de frações de biomoléculas como DNA, RNA e proteínas, pela migração destas num gel, durante a aplicação de um potencial elétrico. Para separar moléculas de DNA, é usada a eletroforese em gel. Normalmente este gel é feito de agarose (um polissacarídeo), que é preparado numa solução tampão. Durante a preparação do gel é adicionado brometo de etídeo, que se intercala nas bases de

DNA, formando um complexo, que, quando é irradiado por luz UV, emite fluorescência, permitindo, assim, visualizar os fragmentos de DNA. A percentagem de agarose pode variar entre os 0,8 e 3,0% (Pierce, 2004; McPherson e Moller, 2006).

As amostras de DNA foram misturadas com *loading buffer* antes da aplicação no gel. Este tampão é uma solução composta por azul de bromofenol e glicerol, utilizados com o objetivo de aumentar a densidade das amostras, impedindo que saiam do gel, além de dar a coloração, que serve como indicador do progresso eletroforético. Foi também adicionado um marcador de peso molecular, que é uma mistura de fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, que serve para se comparar a distância percorrida pelos fragmentos das amostras com os do marcador (Pierce, 2004; McPherson e Moller, 2006). O marcador utilizado foi o *PUC 8 MIX* (Fermentas, Lituânia). A corrida eletroforética deu-se a voltagens entre os 100-140V, durante 40-70 minutos, de acordo com a dimensão do gel. As bandas foram observadas sob radiação UV, recorrendo ao transiluminador do equipamento *ChemiDoc™ XRS* (Bio-Rad, Estados Unidos da América).

3.7 Purificação dos produtos de PCR

Esta técnica tem como objetivo eliminar vestígios de *primers* e dNTP's que permanecem na mistura do produto de PCR após a amplificação, de modo a não interferirem com o processo de sequenciação. Neste estudo recorreu-se à *ExoSAP-IT®* (Affimetrix®), que contém duas enzimas hidrolíticas, a *exonuclease I* e a *fosfatase alcalina*. Relativamente à primeira, degrada *primers* e restos de DNA de cadeia simples (ssDNA) inespecíficos, produzidos durante a PCR, enquanto que a segunda hidroliza dNTP's (N = A, C, G, T) que ficaram livres e que podem prejudicar a reação de sequenciação (Werle *et al.*, 1994). Utilizaram-se 2 µL de *ExoSAP®*/10 µL de produto, à temperatura de 37°C, com inativação a 80°C.

3.8 PCR de sequenciação e sequenciação automática

Esta técnica baseia-se nos mesmos princípios descritos para a técnica de PCR de amplificação. A reação tem o mesmo fundamento, mas com duas diferenças principais:

1. Uso de apenas um *primer* (*forward* ou *reverse*);
2. Uso de di-desoxi-nucleótidos marcados com fluorescência (ddNTP's).

Atualmente, a técnica mais utilizada para sequenciar DNA é a de Sanger, assim denominada em homenagem a Fred Sanger que, com Walter Gilbert, recebeu o prémio Nobel de química, em 1980 (Sanger *et al.*, 1977). O método de Sanger, ou “di-desóxi” para sequenciação de DNA, baseia-se no processo de replicação. Nesta técnica usam-se nucleótidos especiais, denominados ddNTP's, idênticos aos dNTP's, com a diferença de que lhes falta um grupo 3'OH. Quando é incorporado um ddNTP numa cadeia de DNA, não pode ser adicionado mais nenhum nucleótido, pois não há grupo 3'OH para formar uma ligação fosfodiéster com o nucleótido seguinte, interrompendo-se a síntese de DNA.

Na metodologia clássica de Sanger, a reação ocorre em quatro tubos distintos. O *primer* liga-se à sua sequência complementar na extremidade da cadeia, para que se inicie a síntese de DNA. A partir desse *primer*, a DNA polimerase faz a extensão de uma nova cadeia de DNA, usando-a como molde. Existem mais dNTP's do que ddNTP's na mistura de reação, permitindo que a síntese de DNA continue. Ocasionalmente, é incorporado um ddNTP, aleatoriamente, em posições diferentes em fragmentos diferentes, produzindo um conjunto de cadeias de tamanhos diferentes. As reações que ocorrem em cada tubo são equivalentes, recebendo apenas um ddNTP diferente. Quando terminada a síntese, o DNA dos tubos é desnaturado e os produtos de cadeia simples de cada reação são separados por eletroforese em gel. Os conteúdos dos quatro tubos são separados lado a lado nesse gel, de modo que as cadeias de DNA mais curtas migram mais rapidamente que as mais longas. Após a eletroforese, o gel é revelado por auto-radiografia.

Durante a reação, a incorporação de dNTP's e ddNTP's ocorre ao acaso. No entanto, quando é incorporado um ddNTP, não são incorporados mais nucleótidos, razão pela qual os ddNTP's são designados por nucleótidos de terminação. Assim, no final da reação, são gerados fragmentos de diferentes

tamanhos, cujo nucleótido final (ddNTP) será posteriormente detetado na leitura da sequência no processo de sequenciação. Os ddNTP's usados são marcados com um agente fluorescente, diferente para cada nucleótido. Os fragmentos de diferentes tamanhos separam-se no capilar que contém o gel e migram, passando por um laser e um detetor. Os fluorocromos são ativados e a fluorescência é detetada, gerando um gráfico de picos correspondentes a cada nucleótido, obtendo-se assim a sequência do DNA em estudo (eletroferograma).

A mistura de reação para PCR de sequenciação utilizada neste trabalho continha um volume final de 10 µL que incluiu: *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) e respetivo tampão, DNA, *primer* (2,5 µM) e H₂O *MilliQ*.

No termociclador, o programa utilizado para esta reacção foi de 45 ciclos (96°C, 10"; 55°C, 5"; 60°C, 4').

Em seguida, o DNA foi purificado, com o objetivo de eliminar resíduos, aumentando a qualidade das sequências produzidas. Neste trabalho, recorreu-se à purificação com *Sephadex*, uma técnica descoberta em 1957.

O *Sephadex* é um polímero utilizado para separar biomoléculas, que forma uma rede, sendo utilizada como método de separação. Este polímero é solúvel em água e, por centrifugação, formar-se uma coluna, que pode ser usada para filtração. O produto de PCR de sequenciação foi colocado na coluna e submeteu-se a centrifugação (2000xg), de modo a purificar o DNA.

3.9 Análise *in silico*

Após a análise das sequências obtidas por sequenciação automática, as alterações encontradas foram inseridas numa base de dados (MITOMAP, 2012) e no *MitoAnalyzer*, para obter a descrição da alteração encontrada, incluindo o aminoácido e a sua posição na proteína.

Nos casos em que se verificou que a substituição conduzia a alteração do aminoácido na posição em causa, recorreu-se a duas ferramentas *in silico*: *PolyPhen-2*[®] – *Polimorphism Phenotyping v2* (Adzhubei et al., 2010) e *SIFT*[®] – *SIFT Aligned Sequences* (Ng e Henikoff, 2006). A primeira é uma ferramenta que dá uma previsão do possível impacto de uma substituição de aminoácido na estrutura e função da proteína, com base em considerações físicas e

comparativas. A segunda dá uma previsão do mesmo tipo, baseando-se no grau de conservação de aminoácidos no alinhamento de sequências de diferentes espécies, introduzidas pelo utilizador. Por último, também se analisou a conservação evolutiva para estes casos, tendo-se recorrido a uma ferramenta de alinhamento *UniProt*[®].

3.10 Análise estatística

No sentido de avaliar se os dados da análise do número de cópias seguiam uma distribuição Gaussiana, foram realizados testes de normalidade, visto a análise estatística posterior a aplicar depender do tipo de distribuição dos dados em análise. Relativamente ao teste *t de Student*, por exemplo, apenas pode ser usado em dados que sigam um tipo de distribuição denominado normal, de acordo com uma distribuição em curva tipo *Gaussiana*.

Para proceder à comparação dos resultados obtidos neste trabalho, quando os dados não seguiam uma distribuição *Guassiana*, realizou-se uma análise estatística *A-NOVA* para comparações múltiplas – teste de *Kruskal-Wallis*, *Post-test Dunn* ou teste Mann-Whitney.

Uma diferença é considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Foi sempre aplicado um intervalo de confiança (CI) de 95% e as diferenças significativas estão indicadas por asterisco.

O *software* usado para a análise estatística referida foi o *Prism v4.0*[®] para Windows, GraphPad Software (Motulsky, 1999).

IV – Resultados

4.1 Quantificação do número de cópias de mtDNA

Através do método de PCR em tempo real foi quantificado o número de cópias de mtDNA para as amostras de DH e DP, de acordo com os objetivos anteriormente mencionados.

Na Figura 14 encontram-se os resultados relativos às amostras de DH organizados por controlos e doente, nas diversas concentrações de BrEt usadas. No presente estudo, foram analisadas células controlo correspondentes a diferentes linhas celulares de linfoblastos.

A partir destes dados obteve-se o seguinte gráfico:

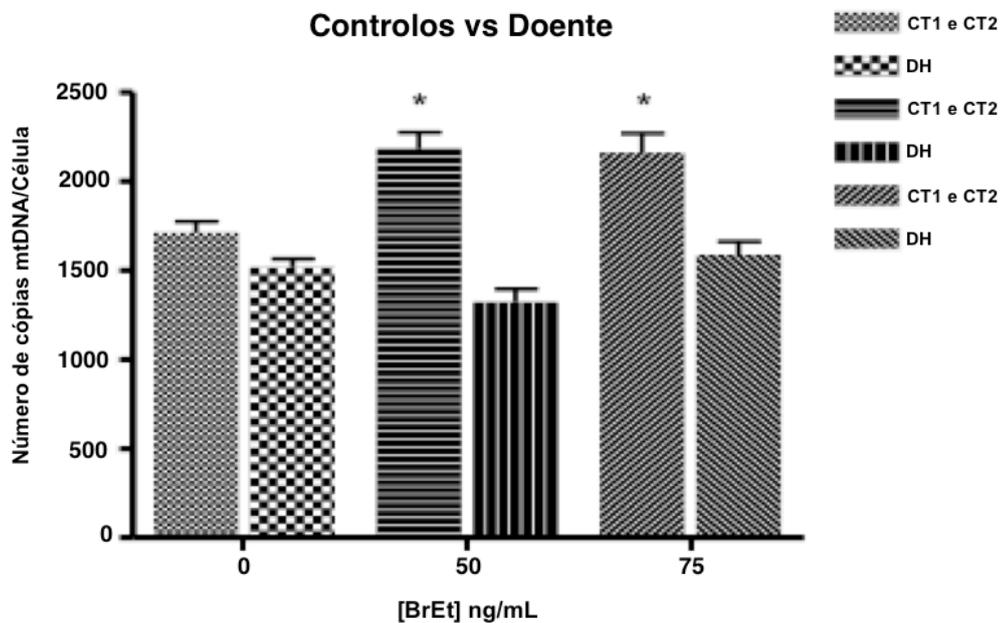


Figura 14. Número de cópias de mtDNA/célula, para as células controlo e doente, para as diferentes concentrações de BrEt a que foram expostas.

Após a análise estatística dos dados, é possível concluir que, em relação aos controlos, há uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de 0 e 50 ng/mL de BrEt, assim como entre as concentrações de 0 e 75 ng/mL visto $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respetivamente. Procedendo a uma comparação entre controlos e doente para a mesma concentração de BrEt, apenas se verificou uma diferença estatisticamente significativa para as

concentrações de 50 e 75 ng/mL de BrEt, com $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respetivamente. No que diz respeito à comparação entre as diferentes concentrações para o doente, não se observaram diferenças estatisticamente significativas para qualquer uma das condições.

No que diz respeito às amostras de DP, os resultados são mostrados na Figura 15. Os dados estão organizados pela presença (+Dox) ou ausência (-Dox) de doxiciclina, que resulta na expressão normal ou sobre-expressão de alfa-sinucleína, respetivamente. Os ensaios foram realizados duas vezes, cada um em triplicado, originando um valor de $n=12$ para cada condição.

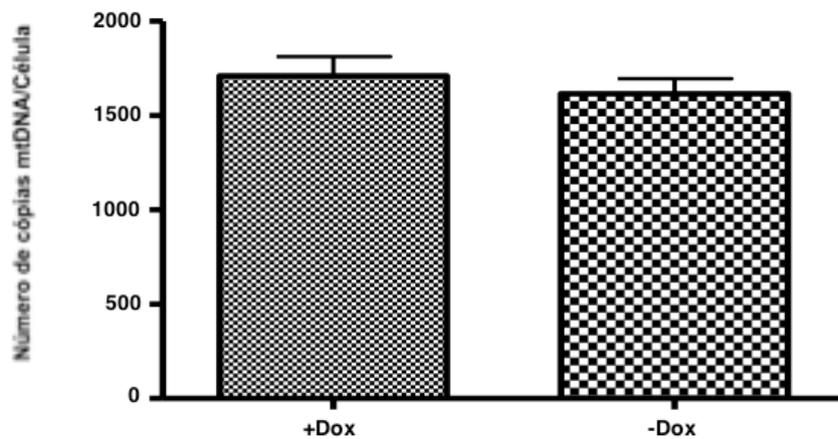


Figura 15. Número de cópias de mtDNA/célula, para as amostras de Parkinson, para as condições +Dox e -Dox.

De acordo com a análise estatística, a diferença entre o número de cópias detetado para as condições +Dox e -Dox não é estatisticamente significativa, com um valor de $p=0,2356$.

4.2 Sequenciação dos sete genes *MT-ND* nas amostras de DP

No que diz respeito à sequenciação das amostras de DP, após amplificação (Figura 16) dos genes em estudo realizaram-se os procedimentos subsequentes até à sequenciação automática e análise da presença de alterações.

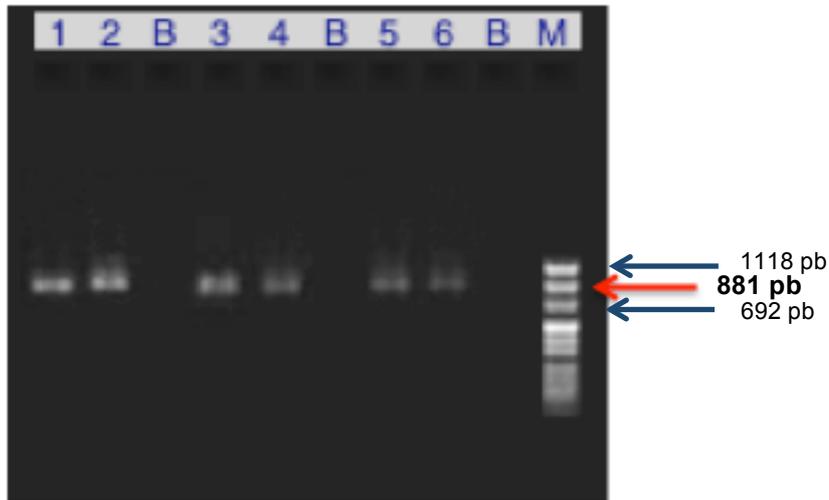


Figura 16. Exemplo de uma imagem de gel de agarose corado com brometo de etídeo, relativo à amplificação de um fragmento em estudo.

Legenda: Os números, dois a dois, correspondem às duas amostras de DP, para diferentes pares de *primer*. O B representa o controlo negativo para cada mistura de reação e o marcador de peso molecular encontra-se representado pela letra M (*PUC 8 MIX*).

Após análise das sequências, verificou-se a presença de uma alteração em ambas as amostras (Figura 17). Uma vez que a alteração em causa, m.11016G>A, leva a alteração de aminoácido, recorreu-se às ferramentas referidas para o estudo *in silico*. A informação obtida encontra-se resumida na Tabela 5.

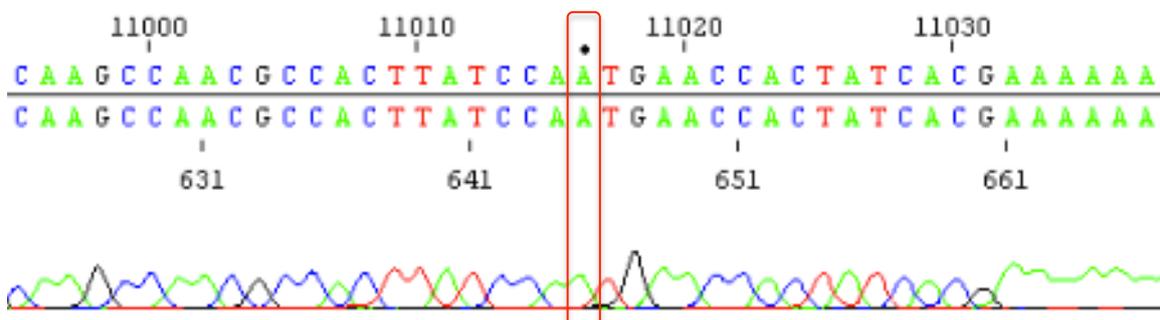
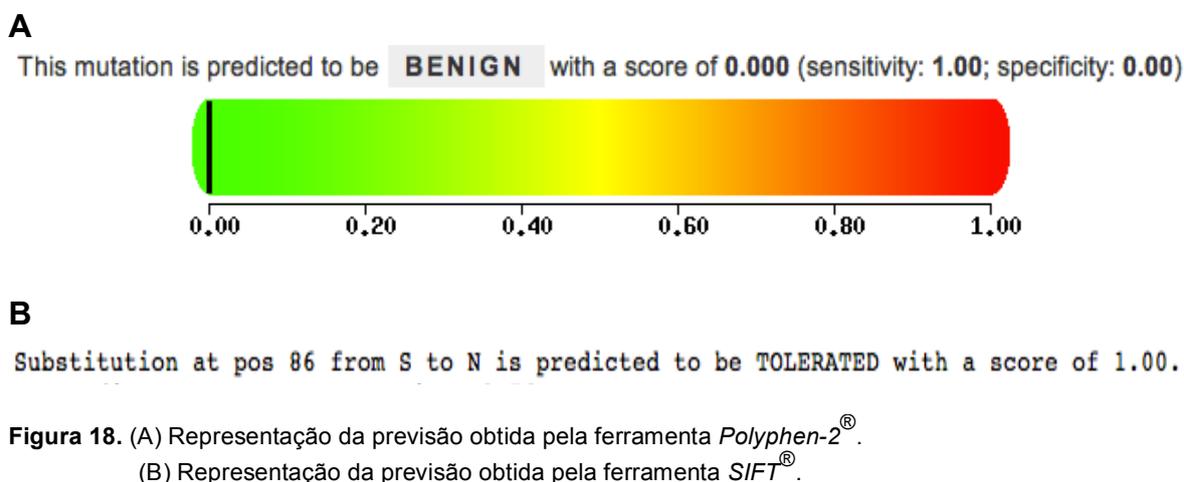


Figura 17. Representação do eletroferograma que mostra o resultado obtido por sequenciação automática, com a alteração detetada (m.11016G>A).

Tabela 5. Resumo da informação obtida do estudo *in silico* para a alteração m.11016G>A.

Alteração	n11016G>A
Descrição (MITOMAP)	Polimorfismo Mutação somática (descrita em tumor da tiróide)
<i>Locus</i>	<i>MT-ND4</i>
Aminoácido	Serina (Ser)
Alterac�o de aminoácido	Sim: Asparagina (Asn)
Posi�o do aminoácido na proteína	86 (de 460)
Tipo de muta�o	Não sin�nima
Tipo de substitui�o	Transi�o
Patogenicidade (<i>PolyPhen-2</i> [®] / <i>SIFT</i> [®])	Benigna / Tolerada

Os resultados para a patogenicidade da alterac o m.11016G>A foram obtidos a partir das previs es do *PolyPhen-2*[®] e *SIFT*[®], tal como evidenciado na Tabela 5. Na Figura 18 encontram-se representados os resultados para cada uma destas ferramentas:



Usando o *UniProt*[®], procedeu-se ao alinhamento das seq ncias de diferentes esp cies, com o objetivo de analisar a conserva o evolutiva do

aminoácido que sofreu alteração (Figura 20), considerando oito espécies para além da espécie humana, na comparação. Assim, as espécies incluídas na análise foram: *Homo sapiens* (HUMANO); *Bos taurus* (BOVINO); *Rattus norvegicus* (RATO); *Mus musculus* (RATINHO); *Gallus gallus* (GALINHA); *Pan troglodytes* (CHIMPANZÉ); *Xenopus laevis* (RÃ); *Drosophila melanogaster* (MOSCA); *Danio rerio* (Zebrafish) (PEIXE).

60	PLTTPLLMLTTWLLPLTIMASQRHLSSEPLSRKKLYLSMLISLQISLIMTFTATELIMFY	119	P03905	NU4M_HUMAN
60	SLSTPLLIITMALLPLMLMASQHLSKENLTRKKLFITMLISLQFLIMTFTAMELILFY	119	P03910	NU4M_BOVIN
60	PLSTPLIILTWTWLLPLMLMASQNHMKKENMMHQKLYISMLISLQIILLIMTFSATELILFY	119	P05508	NU4M_RAT
60	PLSTPLIILTAWLLPLMLMASQNHKKDNNVLQKLYISMLISLQIILLIMTFSATELIMFY	119	P03911	NU4M_MOUSE
60	QISTPLLVLSCWFLPLMIMASQGHLLQHEPHKRRKRMFISTLIIQPFIIILAFSATELMLFY	119	P18939	NU4M_CHICK
60	PLTTPLLMLTAWLLPLTIMASQRHLSNEPLSRKKLYLSMLISLQISLIMTFSATELIMFY	119	P03906	NU4M_PANTR
60	QISTPLLIITCWLLPLMLIASQNHLSNEPISRQRTFITMLVFLQSLIMAFSATELILFY	119	P03912	NU4M_XENLA
56	MSYGLILLSLWICSLMLLASEMINK--HNNYKNLFLNIIILLLLILTFSSMSLFMFY	113	P18931	NU4M_DROME
61	PLSTPLLVLTCWLLPLMLIASQNHINSEPVNRQRMVITLLASLQTFMIMAFGATKIIMFY	120	Q9MIY1	NU4M_DANRE

Figura 19. Resultado do estudo da conservação evolutiva na subunidade ND4 codificada pelo mtDNA, recorrendo ao Uniprot®. As espécies consideradas para a análise foram: a) *Homo sapiens*; b) *Bos taurus*; c) *Rattus norvegicus*; d) *Mus musculus*; e) *Gallus gallus*; f) *Pan troglodytes*; g) *Xenopus laevis*; h) *Drosophila melanogaster*; i) *Danio rerio*.

Os resultados do estudo da conservação evolutiva mostraram que o aminoácido (serina) presente na posição referente à alteração genética m.11016G>A na espécie humana é pouco conservado, encontrando-se apenas na sequência da proteína de uma das espécies estudadas, a *Danio rerio*.

V – Discussão

Ao longo dos anos, tem-se verificado que a mitocôndria está fisicamente ou funcionalmente alterada nas diversas doenças neurodegenerativas. Foram publicadas alterações genéticas relacionadas com algumas doenças neurodegenerativas. No entanto, os mecanismos celulares, moleculares e patológicos subjacentes à progressão dessas doenças e à morte neuronal seletiva permanecem ainda desconhecidos. Diversos estudos têm mostrado alterações ao nível da mitocôndria, nomeadamente defeitos na fosforilação oxidativa, tráfego de cálcio, acumulação de proteínas mutadas na mitocôndria e potencial membranar, que ocorrem nas doenças neurodegenerativas. Tal como já foi descrito, foram descritas algumas destas alterações nas doenças de Huntington e de Parkinson (Gil e Rego, 2008; Kasraie *et al.*, 2008; Vila *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura, os mecanismos de danos e reparação do mtDNA são pouco conhecidos, porém, sabe-se que o mtDNA se encontra sujeito a níveis mais elevados de stress oxidativo do que o nDNA. O mtDNA é particularmente sensível a agentes oxidantes, devido à sua proximidade com a membrana mitocondrial interna e à falta de histonas. Existe também uma relação inversa entre o dano oxidativo do mtDNA em determinados órgãos, como o coração e o cérebro, e o período de vida de mamíferos, sugerindo que a acumulação de danos no mtDNA desempenha um papel importante na causa de vários distúrbios associados ao envelhecimento, cancro e neurodegenerescência (Lee e Wei, 2007; Wallace *et al.*, 2010).

Deste modo, é relevante proceder a uma análise do mtDNA, que no presente estudo, foi realizada através da quantificação do número de cópias de genoma mitocondrial e da sequenciação, dos sete genes *MT-ND*. Como se sabe, a mitocôndria possui múltiplas cópias do seu DNA. O número de cópias de mtDNA não é aleatório, sendo específico do tecido e do seu estágio de desenvolvimento. De facto, o número de cópias alterado pode estar relacionado com doença, tendo sido demonstrado em estudos de esclerose múltipla, diferentes tipos de cancro, diabetes ou cardiomiopatia, entre outros. No entanto, os mecanismos pelos quais ocorre a regulação dos níveis de mtDNA permanecem desconhecidos. Existem diferentes propostas para tentar explicar esta regulação. No geral, as hipóteses centram-se num possível papel das proteínas relacionadas com a replicação do mtDNA (Montier *et al.*, 2009).

Para proceder ao estudo da sequência dos sete genes *MT-ND* do mtDNA, e procurar eventuais alterações, recorreu-se à sequenciação automática. Trata-se de um método adequado para detetar alterações na sequência genética, permitindo também detetar novas alterações. Efetivamente, as alterações no mtDNA estão frequentemente relacionadas com a função comprometida do OXPHOS, sendo um defeito bioquímico bastante comum em doenças neurodegenerativas (Grazina *et al.*, 2006). Tendo em conta os fatores descritos nos capítulos anteriores, tornou-se importante a análise destas do mtDNA, em particular dos genes relacionados com o complexo I.

5.1 Quantificação do número de cópias de mtDNA nas amostras de DH

Relativamente à metodologia utilizada para estudar as amostras de DH, o objetivo foi proceder a esta quantificação a partir de células controlo e doentes, em diferentes concentrações de BrEt. Este é, de facto, um passo essencial para a obtenção de células Rho-0, que servirão para produzir de híbridos de DH, um modelo importante no estudo da DH. Nesse sentido, foi relevante compreender a que concentração de BrEt existiria depleção total do mtDNA, comprovando que as células eram Rho-0. Através da análise dos resultados, verificamos que não foi possível estabelecer uma concentração para a qual existisse depleção total ou mesmo parcial. Mais importante, para nenhuma concentração, de controlos ou doente, se verificou uma depleção total do mtDNA, tal como evidenciado na Figura 14. Pelo contrário, observou-se um aumento do número de cópias de mtDNA, em controlos, para as concentrações de BrEt usadas, podendo evidenciar um efeito compensatório na replicação do mtDNA, referida noutras situações (Bai e Wong, 2005; Yu *et al.*, 2007; Montier *et al.*, 2009).

Uma vez que não ocorreu uma depleção total do mtDNA, evidencia-se que não é possível a utilização das células estudadas para a obtenção de híbridos. De facto, pela análise da literatura, verifica-se que é comum a maioria dos estudos não referirem a confirmação da não existência de mtDNA, mencionando apenas a exposição ao BrEt (Swerdlow *et al.*, 1999; Swerdlow, 2007). Por outro lado, outros estudos recorreram indiretas a evidências como sinal da ausência de mtDNA (Yu

et al., 2007). De entre os estudos nos quais foi referida a criação de células Rho-0, destaca-se o uso de técnicas como o *Southern Blot*, consumo de oxigénio ou PCR convencional (Lee *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2007). Não pretendendo pôr em causa a depleção de mtDNA nesses estudos, seria essencial a quantificação do número de cópias de mtDNA, por ser a única forma de obtenção de células Rho-0. Assim, a quantificação do número de cópias de mtDNA por PCR em tempo real é, não só uma forma de confirmar a ausência de mtDNA, mas também um método de quantificação. De acordo com os dados da literatura, encontrou-se um estudo no qual foram combinadas diferentes técnicas com o objetivo de ter a certeza máxima quanto à depleção total (Yu *et al.*, 2007). Neste trabalho, os autores mediram o potencial membranar da mitocôndria (que estava reduzida) e analisaram a sua morfologia (que estava alterada). Para além disso, utilizaram a técnica de *DNA dot blot*, que deteta mtDNA, para mostrar que este estava ausente. Por último, amplificaram o gene *MT-COX2* do mtDNA e a região *D-loop* por PCR convencional, em específico, tendo também evidenciado a ausência de mtDNA nas células Rho-0 (Yu *et al.*, 2007). A técnica de qPCR-RT seria uma forma mais simples e rápida de confirmar a depleção total de mtDNA, em vez de seguir todos os procedimentos referidos, quase todos indiretos e nenhum que permitisse quantificar o mtDNA.

O nosso estudo evidenciou que, com as concentrações de BrEt utilizadas, não é possível obter células Rho-0 para formar cíbridos.

5.2 Análise das amostras de DP

A ordem dos aminoácidos de uma proteína é determinante para a sua função, pelo que a manutenção desta ordem é crítica. Assim, uma alteração na sequência de nucleótidos poderá produzir uma alteração na sequência de aminoácidos da proteína, afetando a sua estrutura e/ou função. Uma vez que uma alteração de aminoácido pode ter este impacto, torna-se importante a utilização de métodos que possam ajudar a prever se uma alteração tem um impacto negativo na função proteica. Neste sentido, foram realizados estudos *in silico* usando o *Polyphen-2*[®] e *SIFT*[®].

No primeiro, é colocada a sequência ou a sua identificação e a posição do aminoácido em causa, assim como o aminoácido da sequência inicial e da

alterada. A previsão é dada através da conservação de sequências homólogas, escolhidas automaticamente pela ferramenta, e na estrutura da proteína, tendo em conta a posição do aminoácido substituído. Já no *SIFT*[®], são colocadas sequências de espécies definidas pelo utilizador, que são posteriormente alinhadas. Este *software* baseia-se na homologia entre as sequências, sendo a previsão dada por um *score*. Para valores acima de 0,05, a alteração é considerada tolerada, e para valores inferiores prevê-se que afete a função da proteína. Deve-se ter em atenção que, apesar de em ambos a escala de resultados variar de 0,00 a 1,00, o valor máximo de uma das escalas corresponde ao valor mínimo da outra escala, isto é, para o valor de 0,00 no *Polyphen-2*[®] a alteração é benigna, ao passo que no *SIFT*[®] se considera que altere a função da proteína.

Após a sequenciação dos sete genes *MT-ND* das amostras de modelo da DP, foi encontrada, quer para a condição +Dox, quer para a condição -Dox, a alteração m.11016G>A, localizada na subunidade ND4. Esta alteração está descrita no MITOMAP (Mitomap, 2012) como um polimorfismo (PRC) e como mutação somática no mtDNA em patologia humana de tumor da tiróide. De acordo com o estudo onde foi publicada esta alteração, foram detetadas 57 mutações somáticas em 51,5% dos tumores analisados. Para além desta alteração, foram encontradas alterações em outras subunidades do complexo I, assim como nos restantes complexos da CRM codificados pelo mtDNA (Máximo *et al.*, 2002).

Ainda no que diz respeito a esta alteração, a análise *in silico* recorrendo às ferramentas *Polyphen-2*[®] e *SIFT*[®] revelou resultados concordantes, uma vez que ambos prevêm que a alteração de aminoácido seja benigna/tolerada (Tabela 5). De facto, se observarmos a sequência na qual o *Polyphen-2*[®] se baseia podemos constatar que o aminoácido é pouco conservado (Figura 19) tendo em conta as espécies analisadas. O mesmo tipo de conclusão se aplica ao resultado dado pelo *SIFT*[®]. A substituição dá origem a uma alteração de aminoácido, de serina para asparagina. Ambos os aminoácidos são polares, pelo que se considera que existirá menor possibilidade de alterar a estrutura da proteína e, conseqüentemente, a sua função. Este fator é tido em conta pelo *Polyphen-2*[®], o que também poderá contribuir para a previsão dada.

Relativamente a alterações no gene *MT-ND4* na doença de Parkinson, um grupo encontrou pela primeira vez uma mutação pontual, m.11778G>A, num caso familiar de DP. Este doente apresentava neurodegenerescência da substância *nigra*, e foi sugerida uma associação entre a mutação e a DP. De acordo com este mesmo estudo, apesar de terem sido encontradas mutações no mtDNA em doentes de Parkinson, não foram identificadas mutações de carácter claramente patogénico nestes doentes (Grazina *et al.*, 2003). Embora estas variações no mtDNA permaneçam como uma possibilidade a considerar na DP, os dados recolhidos por Clark e colaboradores conduziram à hipótese de que as mutações somáticas no mtDNA poderem contribuir para o comprometimento da função do complexo I na DP (Clark *et al.*, 2011). Assim, a alteração detetada neste estudo, pode estar relacionada com uma alteração da função da NADH desidrogenase, em sinergia com outras alterações e/ou outros fatores não identificadas no presente trabalho. Tal como já foi referido, estudos anteriores evidenciaram que a inibição do complexo I (já reportada em casos de DP) promove a agregação da alfa-sinucleína em culturas celulares e em modelos animais da doença (Lee *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2003). Deste modo, caso a alteração m.11016G>A estivesse relacionada com o funcionamento normal do complexo I, poder-se-ia colocar a hipótese de estar correlacionada com a agregação da proteína em doentes de Parkinson. No entanto, esta alteração foi detetada quer nas amostras +Dox quer nas -Dox. Efetivamente, apenas na condição -Dox se verifica uma sobre-expressão da alfa-sinucleína, que está relacionada com a sua agregação. Tendo em conta estes aspectos, a alteração não seria específica em relação à agregação da proteína, apesar de poder contribuir para uma alteração na atividade do complexo I. Em todo o caso seria necessário estudos adicionais para esclarecer esta questão.

No que diz respeito à quantificação do número de cópias de mtDNA nas amostras de modelo da DP em estudos os resultados obtidos, sugerem que parece não existir uma relação entre a expressão e sobre-expressão de alfa-sinucleína com o número de cópias, uma vez que não existe uma diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos para as duas condições estudadas. Isto é, o número de cópias para uma expressão normal de proteína (+Dox) não apresenta uma diferença estatisticamente significativa em relação à sobre-expressão da proteína (-Dox). Analisando a literatura disponível, é possível

observar que não existe concordância entre os resultados obtidos, dado que ainda não se estabeleceu se o número de cópias aumenta ou diminui em certas condições, nem como essa regulação é estabelecida. A patologia na qual existem mais estudos do número de cópias de mtDNA e na qual existe maior consenso entre os resultados é o cancro, onde se tem verificado um aumento do número de cópias. A explicação mais frequentemente dada pelos autores destes trabalhos está relacionada com a possibilidade de o aumento ser resultante de um efeito compensatório de deleções no mtDNA (Yu *et al.*, 2007; Montier *et al.*, 2009). Em relação a estudos em doenças neurodegenerativas, são escassos os trabalhos relacionados com o número de cópias do mtDNA. No entanto, em estudos anteriores, verifica-se que esta quantificação foi utilizada no sentido de a relacionar a deleções de grande escala no mtDNA (Bai e Wong, 2005; Frahm *et al.*, 2005; Bonner *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007), que não se detetaram no nosso estudo. Porém, mesmo nesses estudos não se verificou uma relação clara entre as deleções e o número de cópias, pois os resultados foram heterogéneos. No presente trabalho não se observou concordância entre a quantificação realizada e a expressão ou sobre-expressão de alfa-sinucleína, assim como não se observou uma ligação específica entre a alteração detetada e estas duas condições.

VI – Considerações finais

Existem alguns dados na literatura que têm mostrado a utilidade dos cíbridos para o estudo de doenças neurodegenerativas, relacionado com a disfunção mitocondrial. De facto, este modelo permite mimetizar os defeitos bioquímicos mitocondriais, permitindo assim estabelecer uma comparação entre o fenótipo entre cíbridos obtidos a partir da fusão de uma linha celular Rho-0 com células anucleadas contendo mitocôndrias normais ou mitocôndrias de doentes. Porém, e como já foi referido, a obtenção destas células depende de um primeiro passo, a produção de células Rho-0, células totalmente desprovidas de mtDNA.

No nosso estudo, não se observou depleção do mtDNA, quer nas células controlo quer nas de doente. Assim, a produção de cíbridos estará limitada, uma vez que o primeiro passo não foi conseguido e dele depende a produção final de cíbridos para, futuramente, estudar com detalhe o papel da mitocôndria na DH.

A PCR em tempo real revelou-se uma técnica importante na análise do número de cópias, dado que permite obter uma quantificação precisa do número de moléculas de mtDNA nas células em estudo, para além de se tornar uma boa alternativa ao conjunto de técnicas utilizado noutros trabalhos, para averiguar a depleção. Por outro lado, poderá ser útil na otimização da obtenção de células Rho-0, uma vez que é simples e os resultados são obtidos rapidamente, até que se verifique depleção total, sendo, assim, possível avançar posteriormente para a fusão e formação de cíbridos.

De acordo com diversos estudos, o número de cópias de mtDNA é específico do tecido e do seu estágio de desenvolvimento (Frahm *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007), tendo já sido demonstrada a alteração do número de cópias deste genoma em diversas doenças (Bai e Wong, 2005; Yu *et al.*, 2007; Montier *et al.*, 2009). Contudo, os resultados para doenças neurodegenerativas são escassos e heterogéneos. Neste trabalho, analisámos o número de cópias em células usadas como modelo de DP, que, através de um sistema *Tet-off*, expressam ou sobre-expressam a alfa-sinucleína. De acordo com o que sabe desta proteína em relação à bioenergética mitocondrial, pareceu importante avaliar o número de cópias de mtDNA e sequenciar os genes *MT-ND* nestas células. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os valores de número de cópias para +Dox e -Dox. Relativamente à sequenciação, foi detetada a alteração m.11016G>A em ambas as condições. Apesar desta alteração estar descrita como um polimorfismo, de ter sido encontrada nas condições +Dox e -Dox e de

não parecer existir uma relação entre o número de cópias nestas condições, não se pode excluir a possível relação do mtDNA com a alfa-sinucleína na DP. Além disso, estudos anteriores já mostraram uma associação entre alterações no mtDNA e a DP. Outros estudos revelaram que a inibição da atividade do complexo I poderá conduzir à agregação da proteína. Deste modo, seria importante avaliar a atividade deste complexo nas células em estudo, para compreender melhor esta relação.

O estudo que apresentamos é inovador e representa uma contribuição muito significativa no estudo de células Rho-0, pois demonstrámos que a quantificação do número de cópias de mtDNA é essencial para comprovar a existência de depleção total do mtDNA.

VII – Referências bibliográficas

- Acevedo-Torres K, Berríos L, Rosario N, Dufault V, Skatchkov S, Eaton M, Torres-Ramos C, Ayala-Torres S; 2009; Mitochondrial DNA damage is a hallmark of chemically induced and the R6/2 transgenic model of Huntington's disease; *DNA Repair (Amst)*; 8: 126-136.
- Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky V, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov A, Sunyaev S; 2010; *Nat Methods*; 7: 248-249.
- Albin R, Young A, Penney J; 1989; The functional anatomy of basal ganglia disorders; *Trends Neurosci.*; 12: 366-375.
- Andrade M, Bork P; 1995; HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*; 11:115-116.
- Andrew S, Goldberg Y, Kremer B, Telenius H, Theilmann J, Adam S, Starr E, Squitieri F, Lin B, Kalchman M and et al.; 1993; The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*; 4: 398-403.
- APDH: Associação Portuguesa de doentes de Huntington; (<http://www.huntington-portugal.com>, 2007).
- Arya M, Shergill I, Williamson M, Gommersall L, Arya N; 2005; Basic principles of real-time quantitative PCR; *Expert Rev Mol Diagn*; 5: 209-219.
- Attardi G; 1985; Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy; *Int. Rev. Cyt*; 93: 93-145.
- Bai R, Wong L; 2005; Simultaneous detection and quantification of mitochondrial DNA deletion(s), depletion, and over-replication in patients with mitochondrial disease; *J Mol Diagn*; 7: 613- 622;
- Banoei M, Houshmand M, Panahi M, Shariati P, Rostami M, Manshadi M, Majidzadeh T; 2007; Huntington's disease and mitochondrial DNA deletions: event or regular mechanism for mutant huntingtin protein and CAG repeats expansion?!; *Cell Mol Neurobiol*; 27: 867-875.
- Bates G; 2005; History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nat Rev Genet*; 6: 766-773.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L; 2002; Biochemistry; 5ª edição.
- Betarbet R, Sherer T, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov A, Greenamyre J; 2000; Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease; *Nat Neurosci*; 3 :1301-1306.
- Bonner M, Shen M, Liu C, DiVita M, He X e Lan Q; 2009; Mitochondrial DNA Content and Lung Cancer Risk; *Lung Cancer*; 63: 331-334.
- Borrell-Pages M, Zala D, S. Humbert, F. Saudou; 2006; Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies; *Cell Mol Life Sci*; 63: 2642-2660.
- Braak H, Del T, Rub U, de Vos R, Jansen Steur E, Braak E; 2003; Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease; *Neurobiol Aging*; 24: 197- 211
- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del T; 2004; Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology; *Cell Tissue Res*; 318: 121-134.
- Brandt J; 1991 Cognitive impairments in Huntington's disease: insights into the neuropsychology of the striatum. *Em Boller F, Grafman J; Handbook of neuropsychology*; Elseviers Sciences Publishers BV.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D; 2005; 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease; *J Neurochem*; 95: 1521-1540.
- Browne S, Bowling A, MacGarvey U, Baik M, Berger S, Muqit M, Bird E, Beal M; 1997; Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia; *Ann Neurol*; 41: 646-653.
- Bruyn G; 1968; Huntington's chorea; historical, clinical and laboratory synopsis; Amsterdam.
- Bruyn G, Went L; 1986; Huntington's chorea. *Em: Vinken P, Bruyn G, Klawans H; Handbook of clinical Neurology*; Elsevier Science Publisher BV.

- Buitrago J, Jimenez J; 2001; *Patologia Molecular*; 1ª edição; Aravaca; Mcgraw- Hill Interamericana de España, SA.
- Caine E, Fisher J; 1985; Dementia in Huntington's disease; *Em: Frederiks JAM. Handbook of clinical neurology*; Elsevier Science Publisher BV.
- Cann R, Stoneking M, Wilson A; 1987; Mitochondrial DNA and Human Evolution; *Nature*; 325: 31-36.
- Cardellach F, Marti M, Fernandez-Sola J, Marin C, Hoek J, Tolosa E, Urbano-Márquez A; 1993; Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease; *Neurology*; 43: 2258–2262.
- Carroll J, Fearnley I, Shannon R, Hirst J, Walker J; 2003; Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria; *Mol Cell Proteomics*; 2: 117–126.
- Carroll J, Fearnley I, Skehel J, Shannon R, Hirst J, Walker J; 2006; Bovine complex I is a complex of 45 different subunits; *J Biol Chem*; 281: 32724–32727.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M; 2005; Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease; *Nat Rev Neurosci*; 6: 919-930.
- Cha J; 2000; Transcriptional dysregulation in Huntington's disease; *Trends Neurosci*; 23:387–392.
- Chang D, Rintoul G, Pandipati S, Reynolds I; 2006; Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons; *Neurobiol Dis*; 22: 388-400.
- Charvin D; 2005; Dopamine et dégénérescence des neurones striataux dans la maladie de Huntington : vers l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques; *Neurosciences*; Dissertação de doutoramento; Université de Paris VI; Paris.
- Clark J, Dai Y, Simon D; 2011; Do Somatic Mitochondrial DNA Mutations Contribute to Parkinson's Disease?; *Parkinsons Dis*.
- Conway K, Harper J, Lansbury P; 1998; Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease; *Nat Med*; 4: 1318-1320.
- Damiano M, Galvan L, Déglon N, Brouillet E; 2010; Mitochondria in Huntington's disease; *Biochim Biophys Acta*; 1802: 52-61;
- Dauer W, Przedborski S; 2003; Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*; 39: 889-909.
- Davidson W, Jonas A, Clayton D, George J; 1998; Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes; *J Biol Chem*; 273: 9443-9449.
- de la Monte S, Vonsattel J, Richardson E; 1988; Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease; *J Neuropathol Exp Neurol*; 47: 516-525.
- De Robertis; 2003; *Bases da Biologia Celular e Molecular*; 3ª edição; Rio de Janeiro; Guanabara-Koogan.
- de Tommaso M, Sciruicchio V, Spinelli A, Specchio N, Difruscolo O, Puca F, Specchio L; 2001; Features of the blink reflex in individuals at risk for Huntington's disease; *Muscle Nerve*; 24: 1520-1525.
- Dias J, Felgueiras M, Sanchez J, Gonçalves J, Falcão J, Pimenta Z; 1994; The prevalence of Parkinson's Disease in Portugal. A population approach. *Eur J Epidemiol*; 10 :763-767.
- DiFiglia M; 1990; Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease; *Trends Neurosci*; 13: 286-289.
- DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Davies S, Bates G, Vonsattel J, Aronin N; 1997; Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*; 277: 1990-3.
- DiMauro S, Schon E; 2008; Mitochondrial disorders in the nervous system; *Annu Rev Neurosci*; 31: 91-123
- Distelmaier F, Koopman W, van den Heuvel L, Rodenburg R, Mayatepek E, Willems P, Smeitink J; 2009; Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to

- clinical disease; *Brain*; 132: 833-842.
- Dorak M; 2006; Real-time PCR; New-castle; Taylor & Francis.
- Doty R, Bromley S, Stern M; 1995; Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. *Neurodegeneration*; 4: 93-97.
- Drolet R, Behrouz B, Lookingland K, Goudreau J; 2006; Substrate-mediated enhancement of phosphorylated tyrosine hydroxylase in nigrostriatal dopamine neurons: evidence for a role of synuclein; *J neurochem*; 96: 950-959.
- Duff K, Paulsen J, Beglinger L, Langbehn D, Wang C, Stout J, Ross C, Aylward E, Carlozzi N, Queller S; 2010; Frontal behaviors before the diagnosis of Huntington's disease and their relationship to markers of disease progression: evidence of early lack of awareness. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*; 22: 196-207.
- Durbach N, Hayden M; 1993; George Huntington: the man behind the eponym. *J Med Genet*; 30: 406-409.
- Ehringer H, Hornykiewicz O; 1960; Verteilung von noradrenalin und dopamine (3-hydroxytyramin) im gehirn des menschen und ihr verhalten bei erkrankungen des extrapyramidalen Systems; *Klinische Wochenschrift*; 38: 1236-1239.
- Elbaz A, Bower J, Maraganore D, McDonnell S, Peterson B, Ahlskog J, Schaid D, Rocca W; 2002; Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease; *J Clin Epidemiol*; 55: 25-31.
- Fan M, Raymond L; 2007; N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease; *Prog Neurobiol*; 81: 272-293.
- Fernandes H, Baimbridge K, Church J, Hayden M, Raymond L, Church J, Hayden M, Raymond L; 2007; Mitochondrial sensitivity and altered calcium handling underlie enhanced NMDA-induced apoptosis in YAC128 model of Huntington's disease; *J Neurosci*; 27: 13614-13623.
- Frahm T, Mohamed S, Bruse P, Gemünd C, Oehmichen M, Meissner C; 2005; Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart; *Mech Ageing Dev*; 126: 1192-1200.
- Friedrich T, Bottcher B; 2004; The gross structure of the respiratory complex I: a Lego system; *Biochim Biophys Acta*; 1608: 1-9.
- Fortin D, Troyer M, Nakamura K, Kubo S, Anthony M, Edwards R; 2004; Lipid rafts mediate the synaptic localization of α -synuclein; *J Neurosci*; 24: 6715-6723.
- Fukui H, Moraes C; 2007; Extended polyglutamine repeats trigger a feedback loop involving the mitochondrial complex III, the proteasome and huntingtin aggregates; *Hum Mol Genet*; 16: 783-797.
- Gegg M, Schapira A; 2011; PINK1-parkin-dependent mitophagy involves ubiquitination of mitofusins 1 and 2: implications for Parkinson disease pathogenesis; *Autophagy*; 7: 243-245.
- George J; 2001; The synucleins; *Genome Biol*; 3: 1-6.
- Giasson B, Uryu K, Trojanowski J, Lee V; 1999; Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J Biol Chem*; 274: 7619-7622.
- Gil-Mohapel J e Rego C; 2010; Doença de Huntington: uma revisão dos aspectos fisiopatológicos; *Rev Neurocienc*; 1-11.
- Gil J, Rego A; 2008; Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease; *Eur J Neurosci*; 27: 2803-2820;
- Giles R, Blanc H, Cann H, Wallace D; 1980; Maternal inheritance of human mitochondrial DNA; *Proc Natl Acad Sci*; 77: 6715-6719.
- Giuletti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C; 2001; An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*; 25: 386-401.
- Goldring E, Grossman L, Krupnick D, Cryer D, Marmur J; 1970; The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with

- ethidium bromide; *J Mol Biol*; 52: 323-335.
- Góes A; 2003; Tipagem Humana por DNA: Otimização de Condições para Análise Pos Morten; Dissertação de doutoramento; Universidade do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro.
- Goetz C, Chmura T, Lanska D; 2001a; Séminal figures in the history of movement disorders: Sydenham, Parkinson, and Charcot: part 6 of the MDS-sponsored history of movement disorders exhibit, Barcelona; *Mov Disord*; 6: 537-540.
- Goetz C, Chmura T, Lanska D; 2001b; The history of Parkinson's disease: part 2 of the MDS-sponsored History of Movement Disorders Exhibit, Barcelona, June 2000. *Mov Disord*; 16: 156-161.
- Goetz C, Poewe W, Rascol O, Sampaio C; 2005; Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Mov Disord*; 20: 523-539.
- Graham R, Deng Y, Slow E, Haigh B, Bissada N, Lu G, Pearson J, Shehadeh J, Bertram L, Murphy Z, et al.; 2006; Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin; *Cell*; 125: 1179–1191.
- Grazina M, Silva F, Januário C, Oliveira M, Cunha L, Oliveira C; 2003; Parkinson's Disease and Mitochondrial DNA NADH Dehydrogenase Subunit 1 Nucleotides 3337-3340: Study in a Population from the Central Region of Portugal (Coimbra); *Eur Neurol*; 50: 60-61.
- Grazina M; 2004; Genoma mitocondrial e déficit energético no diagnostic das doenças da cadeia respiratória mitocondrial; Dissertação de doutoramento; Universidade de Coimbra; Coimbra.
- Grazina M, Pratas J, Silva F, Oliveira S, Santana I, Oliveira C; 2006; Genetic basis of Alzheimer's dementia; *Genes, Brain and Behaviour*; 5: 92-107.
- Greenbaum E, Graves C, Mishizen-Eberz A, Lupoli M, Lynch D, Englander S, Axelsen P, Giasson B; 2005; The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation; *J Biol Chem*; 280: 7800-7807.
- Greenfield J, Bosanquet F; 1953; The brain-stem lesions in parkinsonism; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 16: 213-226.
- Gregoire M, Morais R, Quilliam M, Gravel D. 1984. On auxotrophy for pyrimidines of respiration-deficient chick embryo cells; *Eur J Biochem*; 142: 49-55.
- Guo C, Xu X, Wu J, Liu S; 2008; PCR-SSCP-DNA sequencing method in detecting PTEN gene mutation and its significance in human gastric cancer; *World J Gastroenterol*; 14: 3804-3811.
- Gusella J, MacDonald M, Ambrose C, Duyao M; 1983; Molecular genetics of Huntington's disease; *Arch Neurol*; 50: 1157-1163.
- Hahn-Barma V, Deweer B, Durr A, Dode C, Feingold J, Pillon B, Agid Y, Brice A, Dubois B; 1998; Are cognitive changes the first symptoms of Huntington's disease? A study of gene carriers; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 64: 172-177.
- Harjes P, Wanker E; 2003; The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories; *Trends Biochem Sci*; 28: 425-433.
- Hefter H, Homberg V, Lange H, Freund H; 1987; Impairment of rapid movement in Huntington's disease; *Brain*; 110: 585-612.
- Hirst J, Carroll J, Fearnley I, Shannon R, Walker J; 2003; The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria; *Biochim Biophys Acta*; 1604: 135-150.
- Hoehn M, Yahr M; 1967; Parkinsonismo, onset, progression and mortality; *Neurology*; 17: 427-442.
- Hofhaus G, Attardi G; 1993; Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product; *EMBO J*; 12: 3043–3048.
- Hoogenraad N, Ward L, Ryan M; 2002; Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells; *Biochim Biophys Acta*; 1592: 97-105.
- Huntington G; 1872; On chorea; *Med Surg Rep*; 26: 320-321.

- Ibanez P, Bonnet A, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P, Agid Y, Durr A, Brice A, Singleton A; 2004; Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's; *Lancet*; 364: 1169-1171.
- Ivanov P, Wadhams M, Roby R, Holland M, Weedn V, Parsons T; 1996; Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II; *Nat Genet*; 12: 417-420.
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva H, Kittel A, Saitoh T; 1995; The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system; *Neuron*; 14: 467-75.
- Jakobsen L, Jensen P; 2003; Parkinson's disease: α -synuclein and parkin in protein aggregation and the reversal of unfolded protein stress; *Methods Mol Biol*; 232: 57-66.
- Janssen R, Nijtmans L, van den Heuvel L, Smeitink J; 2006; Mitochondrial complex I: structure, function and pathology; *J Inherit Metab Dis*; 29: 499-515.
- Joel D, Weiner I; 1997; The connections of the primate subthalamic nucleus: indirect pathways and the open-interconnected scheme of basal ganglia-thalamocortical circuitry; *Brain Res Brain Res Rev*; 23: 62-78.
- Kassubek J, Gaus W, Landwehrmeyer G; 2004; Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis; *Neurology*; 62: 523-524.
- Kim J, Moody J, Edgerly C, Bordiuk O, Cormier K, Smith K, Beal M, Ferrante; 2010; Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease; *Hum Mol Genet*; 19: 3919-3935.
- King M, Attardi G; 1989; Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation; *Science*; 246: 500-503.
- King M, Attardi G; 1996; Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol*; 264: 304-313.
- Kirby D, Crawford M, Cleary M, Dahl H, Dennett X, Thorburn D; 1999; Respiratory chain complex I deficiency: an under diagnosed energy generation disorder, *Neurology*; 52: 1255-1264.
- Kirby D, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan M, Wilson C, Ketteridge D, Turnbull D, Thorburn D, Taylor R; 2004; Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS; *J Med Genet*; 41: 784-789.
- Kosaka K, Yoshimura M, Ikeda K, Budka H; 1984; Diffuse type of Lewy body disease: progressive dementia with abundant cortical Lewy bodies and senile changes of varying degree – A New Disease? *Clin Neuropathol*; 3: 185-192.
- Kremer B, Goldberg P, Andrew S, Theilmann J, Telenius H, Zeisler J, Squitieri F, Lin B, Bassett A, Almqvist E, et al.; 1994; A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats; *N Engl J Med*; 330: 1401-1406.
- Kremer B; 2002; Clinical neurology of Huntington's disease; *Em*: Bates , Gillian ; Harper, Peter; Jones, Lesley; Huntington's Disease; New York: Oxford University Press.
- Kirkwood S, Siemers E, Hodes M, Conneally P, Christian J, Foroud T; 2000; Subtle changes among presymptomatic carriers of the Huntington's disease gene; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 69: 773-779.
- Landsverk M, Cornwell M, Palculiet M; 2012; Sequence analysis of the whole mitochondrial genome and nuclear genes causing mitochondrial disorders; *Em Wong L; Biochemical and molecular analysis, methods in molecular biology; Londres; Humana Press;*
- Lang A, Lozano A; 1998; Parkinson's disease. Second of two parts; *N Engl J Med*; 339: 1130-1143.
- Lazarou M, Thorburn D, Ryan M, McKenzie M; 2009; Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease; *Biochim Biophys Acta*; 1793: 78-88.
- Lee H, Yin P, Lu C, Chi C, Wei Y; 2000; Increase of mitochondria and mitochondrial DNA

- in response to oxidative stress in human cells; *Biochem J*; 348: 425-432.
- Lee H, Shin S, Choi C, Lee Y, Lee S; 2002; Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors; *J Biol Chem*; 277: 5411-5417.
- Lee H, Li S, Lin J, Wu C, Yeh D, Wei Y; 2004; Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma; *Mutat Res*; 547: 71-78.
- Lee H, Wei Y; 2007; Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Apoptosis in Aging; *Exp Biol Med*; 5: 592-606;
- Li S, Li X; 2006; Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease; *Trends Genet*; 20: 146-154.
- Li S, Li X; 2006; Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease; *Mol Neurodegener*; 1: 19.
- Liu G, Zhang C, Yin J, Li X, Cheng F, Li Y, Yang H, Uéda K, Chan P, Yu S; 2009; Alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity; *Neurosci Lett*; 454: 187-192.
- Lotharius J, Brundin P; 2002; Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease; *Human molecular genetics*; 11: 2395-2407.
- Ma H, Shieh K, Chen G, Qiao X, Chuang M; 2006; Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR); *The Journal of American Science*; 2.
- MacDonald M; 2003; Huntingtin: alive and well and working in middle management; *Sci STKE*; 207: 48.
- Mambo E, Gao X, Cohen Y, Guo Z, Talalay P, Sidransky D; 2003; Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations; *Proc Natl Acad Sci USA*; 100: 1838-1843.
- Manyam B, Sanchez-Ramos J; 1999; Traditional and complementary therapies in Parkinson's disease; *Adv Neurol*; 80: 565-574.
- Marcora E, Gowan K, Lee J; 2003; Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 100: 9578-9583.
- Massouh M; 2007; Les interneurones geants exprimant la calretinine dans le striatum humain: leur devenir dans la maladie de Huntington. Dissertação de Mestrado; Université Laval; Québec.
- Máximo V, Soares P, Lima J, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M; 2002; Mitochondrial DNA somatic mutations (Point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology; *Am J Patol*; 160: 1857-1865.
- McGeer P, Itagaki S, McGeer E; 1988; Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease; *Acta Neuropathol*; 76: 550-557.
- McPherson M, Moller S; 2006; PCR; 2ª Edição; Nova Iorque; Taylor e Francis.
- Mikaelian E; 2001; La maladie de Huntington; Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'Université Paris V; Paris. Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn D, Ryan M; 2012; Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease; *Biochim et Biophys Acta*; 1817: 851-862.
- Mimaki M, Wang X, McKenzie M, Thorburn D, Ryan M; 2012; Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease; *Biochim Biophys Acta*; 6: 851-62.
- MitoAnalyzer, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, EUA, <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/mitoanalyzer.html>, 2000.
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2011.
- Mohapel J, Rego C; 2011; Doença de Huntington: Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos; *Rev Neurociên*; 1-11;
- Montier L, Janice D, Bai Y; 2009; Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number; *J Genet Genomics*; 36: 125-131.

- Moore D, West A, Dawson V, Dawson T; 2005; Molecular pathophysiology of Parkinson's disease; *Annu Rev Neurosci*; 28: 57-87.
- Motulsky H; 1999; Analysing data with Graphpad Prism; GraphPad Software Inc., San Diego CA; www.graphpad.com.
- Moussaud S; 2011; Étude de l'implication des cellules microgliales et de l' α -synucleine dans la maladie neurodegenerative de Parkinson; Dissertação de Doutorado; Université de Bourgogne;
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H; 1986; Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction; *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*; 51: 263-273.
- Munoz-Sanjuan I, Bates G; 2011; The importance of integrating basic and clinical research toward the development of new therapies for Huntington disease; *J Clin Invest*; 121: 476-483;
- Naarding P, Kremer HP, Zitman FG; 2001; Huntington's disease: a review of the literature on prevalence and treatment of neuropsychiatric phenomena. *Eur Psychiatry*; 16: 439-445.
- Ng P, Henikoff S; 2006; Predicting the Effects of Amino Acid Substitutions on Protein Function; *Annu Rev Genomics Hum Genet*; 7: 61-80.
- Nicklas W, Vyas I, Heikkila R; 1985; Inhibition of NADH- linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl- pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6- tetrahydropyridine; *Life Sci*; 36: 2503–2508.
- Nishioka K, Hayashi S, Farrer M, Singleton A, Yoshino H, Imai H, Kitami T, Sato K, Kuroda R, Tomiyama H, et al.; 2006; Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease; *Ann Neurol*; 59: 298-309.
- Okazaki H, Lipkin L, Aronson S; 1961; Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriplegia in flexion; *J Neuropathol Exp Neurol*; 20: 237-244.
- Olanow C, Perl D, DeMartino G, McNaught K; 2004; Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis; *Lancet Neurol*; 3: 496-503.
- Oliveira C; 2000; Morte neuronal; Colóquio Ciências; 25: 76-88.
- Oliveira M, Menck C; 2001; Biologia Molecular e Evolução. Universidade de São Paulo; São Paulo; Holos Editora.
- Orr H, Zoghbi H; 2007; Trinucleotide repeat disorders; *Annu Rev Neurosci*; 30: 575-621.
- Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Holozin B. 1999; Alpha-synuclein shares physiological and functional homology with 14–3–3 proteins. *J Neurosci*; 19: 5782-5791.
- Pandey M, Varghese M, Sindhu K, Sreetama S, Navneet AK, Mohanakumar KP, Usha R; 2008; Mitochondrial NAD⁺-linked State 3 respiration and complex-I activity are compromised in the cerebral cortex of 3- nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's disease; *J Neurochem*; 104: 420-434.
- Panegyres P; 2004; The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the understanding of human memory; *QJM*; 97: 555-567.
- Parkinson J; 2002; An Essay on the Shaking Palsy. 1817; *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*; 14: 223-236.
- Parks J, Swerdlow R, Parker W; 1999; Decreased NADH ubiquinone oxidoreductase in frontal cortex in Parkinson's disease; *Soc Neurosci Abstr*; 25: 1337.
- Paulsen S, Nopoulos P, Aylward E, Ross C, Johnson H, Magnotta V, Juhl A, Pierson R, Mills J, Langbehn D, et al.; 2010; Striatal and white matter predictors of estimated diagnosis for Huntington disease; *Brain Res Bull*. 82: 201-207.
- Pavese N, Politis M, Tai Y, Barker R, Tabrizi S, Mason S, Brooks D, Piccini P; 2010; Cortical dopamine dysfunction in symptomatic and premanifest Huntington's disease gene carriers; *Neurobiol Dis*; 37: 356-361.
- Penney J, Young A, Shoulson I, Starosta-Rubenstein S, Snodgrass S, Sanchez-Ramos J, Ramos-Arroyo M, Gomez F, Penchaszadeh G, Alvir J, et al.; 1990; Huntington's

- disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symptomatic and asymptomatic individuals; *Mov. Disord*; 5, 93-99.
- Perez R, Waymire J, Lin E, Liu J, Guo F, Zigmond M; 2002; A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis; *J Neurosci*; 22: 3090-3099.
- Perfeito R, Rego C; 2011; Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson; *Rev Neurocienc*; 1-12.
- Perrin R, Woods W, Clayton D, George J; 2002; Interaction of human alpha-synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis; *J Biol Chem*; 275: 34393-34398.
- Perrin R, Woods W, Clayton D, George J; 2001; Exposure to long chain polyunsaturated fatty acids triggers rapid multimerization of synucleins; *J Biol Chem*; 276: 41958.
- Pierce B; 2004; Genética: um enfoque conceitual; Rio de Janeiro; Guanabara Koogan;
- Rahkonen T, Eloniemi-Sulkava U, Rissanen S, Vatanen A, Viramo P, Sulkava R; 2003; Dementia with Lewy bodies according to the consensus criteria in a general population aged 75 years or older; *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 74: 720-724.
- Ramaker C, Marinus J, Stiggelbout A, Van Hilten B; 2002; Systematic evaluation of rating scales for impairment and disability in Parkinson's disease; *Mov Disord*; 17: 867-876.
- Rangone H, Poizat G, Troncoso J, Ross C, MacDonald M, Saudou F, Humbert S; 2004; The serum and glucocorticoid-induced kinase SGK inhibits mutant huntingtin-induced toxicity by phosphorylating serine 421 of huntingtin. *Eur J Neurosci*; 19: 273-279.
- Reddy P, Charles V, Williams M, Miller G, Whetsell W, Tagle D; 1999; Transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA: a paradigm for locomotor changes and selective neuronal loss in Huntington's disease; *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 354: 1035-1045.
- Reddy P, Mao P, Manczak M; 2009; Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease; *Brain Res Rev*; 61: 33-48;
- Rego A, Almeida L; 2005; Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Huntington's Disease; *Curr Drug Targets*; 4: 361-381
- Reiner A, Dragatsis I, Zeitlin S, Goldowitz D; 2003; Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival; *Mol Neurobiol*; 28: 259-276.
- Robinson B, De Meirleir L, Glerum M, Sherwood G, Becker L; 1987; Clinical presentation of mitochondrial respiratory chain defects in NADH-coenzyme Q reductase and cytochrome oxidase: clues to pathogenesis of Leigh disease; *J Pediatr*; 110: 216-222.
- Roos R, Jongen J, van der Velde E; 1996; Clinical course of patients with Parkinson's disease; *Mov Disord*; 11: 236-242.
- Rosenstock T, Duarte A, Rego A; 2010; Mitochondrial-associated metabolic changes and neurodegeneration in Huntington's disease - from clinical features to the bench; *Curr Drug Targets*; 11: 1218-1236.
- Ross C; 2004; Huntington's disease: new paths to pathogenesis; *Cell*; 118: 4-7.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson A (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 74:5463-5467.
- Sapp E, Penney J, Young A, Aronin N, Vonsattel J, DiFiglia M; 1999; Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease; *J Neuropathol Exp Neurol*; 58, 165-173.
- Sato M, Kuroiwa T; 1991; Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell; *Exp Cell Res*, 196: 137-140.
- Schagger H; 2001; Respiratory chain supercomplexes; *IUBMB Life*; 52: 119-128.
- Schippling S, Schneider S, Bhatia K, Münchau A, Rothwell J, Tabrizi S, Orth M; 2009; Abnormal motor cortex excitability in preclinical and very early Huntington's disease; *Biol Psychiatry*; 65: 959-965.
- Schon E; 1994; Mitochondrial DNA and the genetics of mitochondrial disease; *Em Schapira A, DiMauro S; Mitochondrial disorders in neurology; Oxford; Butterworth-Heinemann;*

- Schon E; 2000; Mitochondrial genetics and disease; *Trends Biochem Sci*; 25: 555-560.
- Schrag A, Ben-Shlomo Y, Brown R, Marsden CD, Quinn N; 1998; Young-onset Parkinson's disease revisited--clinical features, natural history, and mortality; *Mov Disord*; 13: 885-894.
- Sherer T, Betarbet R, Stout A, Lund S, Baptista M, Panov A, Cookson M, Greenamyre J; 2002; An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage; *J Neurosci*; 22: 7006-7015.
- Sherer T, Kim J, Betarbet R, Greenamyre J; 2003; Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation; *Exp Neurol*; 179: 9-16.
- Sherrill C, Marshal D, Moser M, Larsen C, Daudé-Snow L, Prudent J; 2004; Nucleic Acid Analysis Using an Expanded Genetic Alphabet to Quench Fluorescence; *J Am Chem Soc*; 126: 4550-4556.
- Serpell L, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther R; 2000; Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-conformation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 4897-4502.
- Shannon K; 2004b; Movement disorders; *Em Bradley W, Daroff R, Fenichel G, Jankovic J; Neurology in Clinical Practice*; 4ª Edição; Philadelphia; Butterworth-Heinemann.
- Shao J, Diamond M; 2007; Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy; *Hum Mol Genet*; 16, 115-123.
- Sharon R, Goldberg M, Bar-Josef I, Betensky R, Shen J, Selkoe D; 2001; Alpha-Synuclein occurs in lipid-rich high molecular weight complexes, binds fatty acids, and shows homology to the fatty acid-binding proteins; *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 9110-9115.
- Shin M, Kajigaya S, McCoy J, Levin B, Young N; 2004; Marked mitochondrial DNA sequence heterogeneity in single CD34+ cell clones from normal adult bone marrow; *Blood*; 103: 553-561.
- Shin J, Fang Z, Yu Z, Wang C, Li S, Li X; 2005; Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol*; 171: 1001-1012.
- Shiwach R, Norbury C; 1994; A controlled psychiatric study of individuals at risk for Huntington's disease; *Br J Psychiatry*; 165: 500-505.
- Siabas O; 1991; La chorée de Huntington: aspects physiopathologiques et thérapeutiques; *Dissertação*; Lille;
- Singleton A, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R; 2003; Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease; *Science*; 302: 841.
- Skladal D, Halliday J, Thorburn D; 2003; Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children; *Brain*; 126: 1905-1912.
- Slonimski PP, Perrodin G, Croft JH. 1968. Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites." *Biochem Biophys Res Commun* 30:232-239.
- Snell R, MacMillan J, Cheadle J, Fenton I, Lazarou L, Davies P, MacDonald M, Gusella J, Harper P, Shaw D; 1993; Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease; *Nat Genet*; 4: 393-397.
- Souza J, Giasson B, Chen Q, Lee V, Ischiropoulos H; 2000; Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha-synuclein polymers; *J Biol Chem*; 275: 18344-18349.
- Souza C; 2005; Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial; *Dissertação de Doutorado* Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre.
- Spillantini M, Divane A, Goedert M; 1995; Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35; *Genomics*; 27: 379-381.
- Strachan T, Read A; 2002; *Genética Molecular Humana*; 2ª Edição; São Paulo; Artmed.

- Suchowersky O, Furtado S; 2004; Parkinson's disease: etiology and treatment; *Em Miller A; Continuum: Lifelong Learning in Neurology; Mov Disorders.* 10: 15-41.
- Sugars K, Rubinsztein D; 2003; Transcriptional abnormalities in Huntington disease; *Trends Genet*; 19: 233-238.
- Sullivan P, Brown M; 2005; Mitochondrial aging and dysfunction in Alzheimer's disease; *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 29: 407-410.
- Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G; 1999; Ubiquitin tag for sperm mitochondria; *Nature*; 402: 371- 372.
- Swerdlow R; 2007; Mitochondria in Cybrids Containing mtDNA From Persons With Mitochondriopathies; *J Neurosci Res*; 85: 3416-3428.
- Swerdlow R, Parks J, Cassarino D, Shilling A, Bennett J, Harrison M, Parker W; 1999; Characterization of Cybrid Cell Lines Containing mtDNA from Huntington's Disease Patients; *Biochem Biophys Res Commun*; 261:701-704.
- Takano H, Gusella J; 2002; The predominantly HEAT-like motif structure of huntingtin and its association and coincident nuclear entry with dorsal, an NF-kB/Rel/dorsal family transcription factor; *BMC Neurosci*; 3:15.
- Thomas E; 2006; Striatal specificity of gene expression dysregulation in Huntington's disease; *J Neurosci Res*; 84: 1151-1164.
- Trushina E, Dyer R, Badger J, Ure D, Eide L, Tran D, Vrieze B, Legendre-Guillemain V, McPherson PS, Mandavilli BS; 2004; Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro; *Mol Cell Biol*; 24: 8195- 8209.
- Thu D, Chot D, Tippett L, Nana A, Hogg V, Synek B, Luthi-Carter R, Waldvogel H, Faull R; 2010; Cell loss in the motor and cingulate cortex correlates with symptomatology in Huntington's disease; *Brain*; 133:1094-1110.
- Tzivion G, Luo Z, Avruch J; 1998; A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity; *Nature*; 394: 88-92.
- Ugalde C, Triepels R, Coenen M, van den Heuvel L, Smeets R, Uusimaa J, Briones P, Campistol J, Majamaa K, Smeitink J, et al.; 2003; Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene; *Ann Neurol*; 54: 665–669.
- Venda L, Cragg S, Buchman V, Wade-Martins R; 2010; α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease; *Trends in Neurosci*; 33: 559-568.
- Videira A; 2001; Engenharia Genética, Princípios e Aplicações; Lisboa; Lidel.
- Vila M, Ramonet D, Perier C; 2008; Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues; *J Neurochem*; 107: 317-328.
- Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R; 2005; Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe; *European Neuropsychopharmacol*; 15: 473-490
- Vonsattel J, Myers R, Stevens T, Ferrante R, Bird E, Richardson E; 1985; Neuropathological classification of Huntington's disease; *J Neuropathol Exp Neurol*; 44: 559-577.
- Vonsattel J, DiFiglia M; 1998; Huntington disease; *J Neuropathol Exp Neurol*; 57: 369-384.
- Wallace D; 1987; Maternal genes: mitochondrial diseases; *Birth defects*; 23: 137-190.
- Wallace D, Fan W, Procaccio V; 2010; Mitochondrial energetics and therapeutics; *Annu Rev Pathol*; 5: 297-348.
- Wechsler D; 1981; Wechsler adult intelligence scale-revised; New York; The Psychological Corporation.
- Weller M, Paul S; 1993; 3-Nitropropionic acid is an indirect excitotoxin to cultured cerebellar granule neurons; *Eur J Pharmacol*; 248: 223-228.
- Weintraub D, Comella C, Horn S; 2008; Parkinson's disease - Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment; *Am J Manag Care*; 14:S40-S48.
- Wilson M, Polansky D, Replogle J, DiZinno J, Budowle B; 1997; A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes; *Hum Genet*; 100: 167-171.

- Wiseman A, Attardi G; 1978. Reversible tenfold reduction in mitochondrial DNA content of human cells treated with ethidium bromide; *Mol Gen Genet*; 167: 51-63.
- www.parkinson.pt
- Xia Y, Saitoh T, Uéda K, Tanaka S, Chen X, Hashimoto M, Hsu L, Conrad C, Sundsmo M, Yoshimoto M, et al.; 2001; Characterization of the human alpha-synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms; *J Alzheimers Dis*; 3: 485-494.
- Xing G, Chen Z, Cao X; 2007; Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function; *Cell Res*; 17: 227-239.
- Yoshino H, Nakagawa-Hattori Y, Kondo T, Mizuno Y; 1992; Mitochondrial complex I and II activities of lymphocytes and platelets in Parkinson's disease; *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*; 4: 27-34.
- Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Li Y, Xu S, Liu C, Gao Y, Yang H, et al.; 2007; Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody; *Neurosci*; 145: 539-555.
- Yu M, Shi Y, Wei X, Yang Y, Zhou Y, Hao Z, Zhang N, Niu R; 2007; Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells; *Toxicology Letters*; 170: 83-93.
- Zeitlin S, Liu J, Chapman D, Papaioannou V, Efstratiadis A; 1995; Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue; *Nat Genet*; 11: 155-163.
- Zeron M, Hansson O, Chen N, Wellington C, Leavitt B, Brundin P, Hayden M, Raymond L; 2002; Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease; *Neuron*; 33: 849-860.
- Zeron M, Fernandes H, Krebs C, Shehadeh J, Wellington C, Leavitt B, Baimbridge K, Hayden M, Raymond L; 2004; Potentiation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity linked with intrinsic apoptotic pathway in YAC transgenic mouse model of Huntington's disease; *Mol Cell Neurosci*; 25: 469-479.
- Zhang J, Montine T, Smith M, Siedlak S, Gu G, Robertson D, Perry G; 2002; The mitochondrial common deletion in Parkinson's disease and related movement disorders; *Parkinsonism Relat Disord*; 8: 165-170.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt B, Goffredo D, Conti L, MacDonald M, Friedlander R, Silani V, Hayden M, et al.; 2001; Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease; *Science*; 293: 493-498.
- Zuccato C, Tartari M, Crotti A, Goffredo D, Valenza M, Conti L, Cataudella T, Leavitt B, Hayden M, Timmusk T, et al.; 2003; Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes; *Nat Genet*; 35: 76-83.