

# Avaliação da Actividade Enzimática da Cadeia Respiratória Mitocondrial na Esclerose Múltipla

Cândida Elsa Frias Mendes

Orientador: Manuela Grazina

Instituto de Bioquímica e Centro de Neurociências e Biologia Celular  
Faculdade de Medicina de Coimbra, Pólo III - Subunidade I de Ensino




---

---

---

---

---

---

---

---

## MS: doença heterogénea – hereditariedade e ambiente

World Distribution of Multiple Sclerosis



<http://sofija.wordpress.com/2007/01>

---

---

---

---

---

---

---

---

## A genética da MS

- ▶ Estudos populacionais apontam para a associação do HLA DR15, DQ6 com a MS, com associações mais fortes entre os descendentes do norte da Europa.
  - ❖ loci candidato: 6p21.3
- ▶ mtDNA na MS:
  - ✓ Elevada transmissão da doença de mãe para filho.
  - ✓ Associação entre LHON e MS.
    - ❖ Mutações de LHON nos nucleótidos 3460 e 11778 em doentes com MS.




---

---

---

---

---

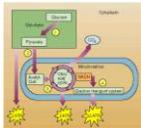
---

---

---



## Mitocôndria como fonte de energia



### Características gerais:

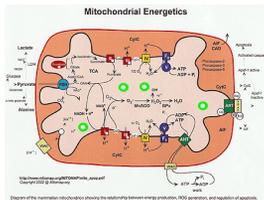
- 2 membranas fosfolipídicas:
  - externa (lisa)
  - interna (dobra-se formando vilosidades, chamadas cristas).

Ciclo ácido cítrico:

- NADH
- FADH<sub>2</sub>

Dadores de -es para a CRM

Fosforilação oxidativa mitocondrial: transferência de -es a partir do NADH para gerar ATP




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

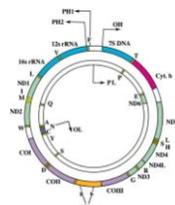
---

---

## Origem bigenômica da CRM

Matriz mitocondrial:

- Proteínas
- Ribossomas
- DNA mitocondrial (forma circular):
  - ▶ 37 genes
  - ▶ 13 peptídeos da CRM
  - ▶ 2 rRNAs
  - ▶ 22 tRNAs




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

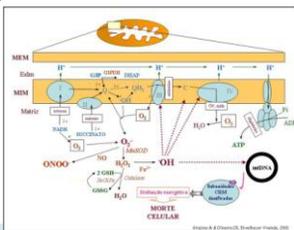
---

---

## Mitocôndria: fonte de espécies reactivas

- ▶ Produção mitocondrial de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - UQH + O<sub>2</sub> → UQ + H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub><sup>-</sup>
  - FMNH + O<sub>2</sub> → FMN + H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub><sup>-</sup>
- H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub> + O<sub>2</sub><sup>-</sup> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + O<sub>2</sub>
- O<sub>2</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → O<sub>2</sub> + OH<sup>-</sup> + OH<sup>•</sup>

- ▶ Produção mitocondrial de NO
  - NO + O<sub>2</sub><sup>-</sup> → ONOO<sup>-</sup>
  - ONOO<sup>-</sup> + H<sup>+</sup> → ONOOH
  - ONOOH → OH<sup>•</sup> + NO<sub>2</sub>



Adaptado de Navarro A, Boveris A. Am J Physiol Cell Physiol 292: C670-C686, 2007

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Mitocôndria: alvo de espécies reactivas



Adaptado de Brown and Borutta, Free Rad Biol Med, 33 (11), 2002

---

---

---

---

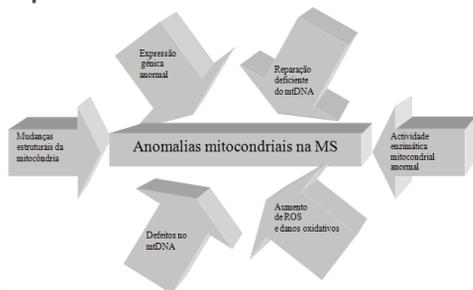
---

---

---

---

## Porque é que a mitocôndria é importante na MS?



[Esquema adaptado de Mao et al, 2009]

---

---

---

---

---

---

---

---

## Stresse oxidativo e desmielinização

ROS e RNS:

- ▶ danos oxidativos no mtDNA;
- ▶ diminuição da actividade enzimática dos complexos da MRC;
- ▶ peroxidação lipídica;
- ▶ peroxidação das proteínas constituintes da mielina;
- ▶ nitrosilação dos resíduos de tirosina.

ROS desestabilizam as bainhas de mielina através da peroxidação dos lípidos das suas membranas.

---

---

---

---

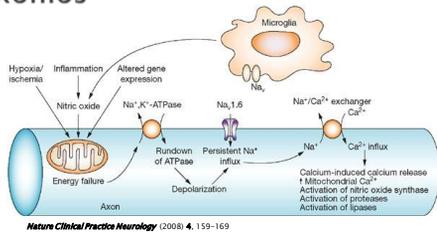
---

---

---

---

## Mecanismo subjacente à perda de axónios



Possivelmente a morte neuronal pode surgir em resultado da exposição dos axónios a NO<sup>2</sup>, em particular devido à sobrecarga de iões Na<sup>+</sup>, resultante do impulso nervoso.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Disfunção mitocondrial na MS




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Objectivos

- ▶ Analisar o envolvimento funcional da OXPHOS na MS.
- ▶ Investigar a correlação destes dados com os estudos de genética molecular do mtDNA.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Relevância Clínica

- ▶ Contribuir para o esclarecimento da etiopatogenia da MS;
- ▶ Encontrar novas ferramentas de diagnóstico.

## Amostragem

### Doentes e controlos

- ✓ Doentes: seguidos no serviço de Neurologia dos HUC; têm MS definitiva.

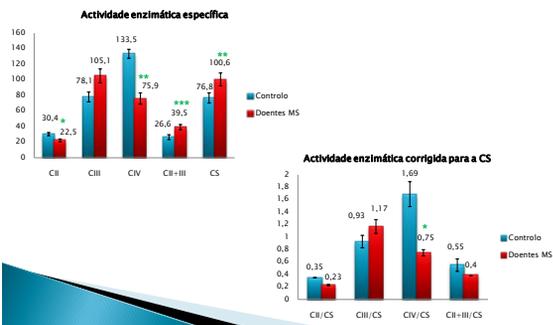
Número de indivíduos	50
Sexo F/M	35/15M
Idade média (anos) ± SD (mín-máx)	40,6 ± 10,9 (22-61)
EDSS média (anos) ± SD (mín-máx)	4,3 ± 2,3 (1-8)
Idade de início média (anos) ± SD (mín-máx)	29,8 ± 10,5 (18-52)
Duração média da doença (anos) ± SD (mín-máx)	13,4 ± 8,4 (2-34)

- ✓ Controlos: sem doenças neurológicas.

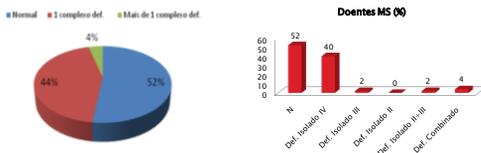
## Ensaio Bioquímico

- ▶ Isolam-se linfócitos a partir de sangue total em EDTA.
- ▶ As actividades espectrofométricas dos complexos da MRC e da CS são medidas de acordo com (Rustin et al, 1994) usando um espectrofotometro de duplo comprimento de onda (Aminco 2000).
- ▶ Faz-se o estudo dos complexos II, III, IV e do segmento II+III da MRC.
- ▶ A CS é usada como enzima mitocondrial de referência.
- ▶ A actividade é considerada deficiente quando  $\leq 40\%$  do valor médio de referência corrigido para a CS (Grazina M, Tese Doutoramento, 2004).

## Resultados Análise Bioquímica da MRC



## Resultados Análise Bioquímica da MRC



Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase

David G. Klapper<sup>1</sup>, Paul G. Brinkman<sup>2</sup>, Robert P. Fisher<sup>2</sup>, Robert G. Anderson<sup>2</sup>, and Victor W. Young<sup>1</sup> (1998) *Journal of Neurochemistry*, 71, 100-108

**BBA**

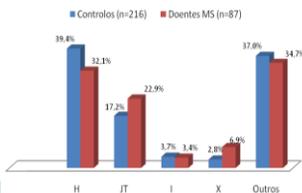
Reviews  
Nitric oxide and mitochondrial respiration  
Clay C. Brana<sup>\*</sup>

Journal of Biochemistry, University of Cambridge, 130(1), 1-10  
Received 3 July 1998; accepted 6 August 1998; available 4 November 1998

## Resultados Estudos genéticos (mtDNA)

Número de indivíduos	87
Sexo F/M	61 F/26 M
Idade (anos) ± SD (mín-máx)	43,3 ± 10,8 (22-63)
EDSS (anos) ± SD (mín-máx)	3,7 ± 2,3 (1-8)
Idade de início (anos) ± SD (mín-máx)	31,9 ± 10,7 (15-57)
Duração da doença (anos) ± SD (mín-máx)	11,3 ± 8,7 (1-39)

### Haplogrupos mtDNA



Teste exacto de Fisher:  
- não existem diferenças estatisticamente significativas.

## Resultados Estudos genéticos (mtDNA)

Varição de sequência do mtDNA	Controlos (n=50) (n) frequência	Doentes MS (n=87) (n) frequência
ausente	(43) 86%	(38) 43,7%
4216T>C	(3) 6%	(20) 23%
4937A>C	(2) 4%	(15) 17,2%
13708G>A	(1) 2%	(15) 17,2%
15257G>A	(1) 2%	(4) 4,6%

As mutações patogénicas 3460,11778,14459, 14484, não foram detectadas em nenhuma amostra.

$\chi^2 = 14,10$ ;  $p^* = 0,0070$



## Resultados Correlação Bioquímica –Genética

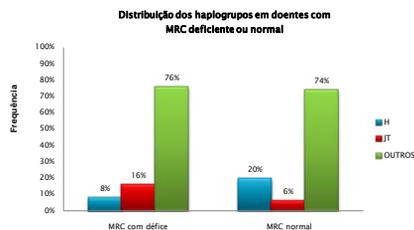
Haplogrupo	Doentes MS (n=87)	Doentes MS (n=50)
H	27 (31%)	14 (28%)
JT	20 (23%)	11 (22%)
OUTROS	40 (46%)	25 (50%)

$\chi^2 = 0,2197$ ;  $p = 0,8960$

Alterações mtDNA	Doentes MS (n=87)	Doentes MS (n=50)
Sem	38 (43,7%)	26 (52%)
Com	49 (56,3%)	24 (48%)

$\chi^2 = 0,8834$ ;  $p = 0,3473$

## Resultados Correlação Bioquímica –Genética



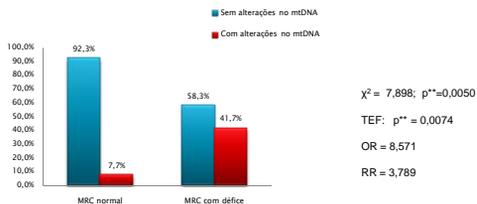
$\chi^2 = 4,857$ ;  $p=0,0881$

Teste exacto de Fisher: não existem diferenças estatisticamente significativas.

## Resultados

### Correlação Bioquímica – Genética

Distribuição de doentes com ou sem alterações ao nível do mtDNA no grupo de doentes com/ sem défice na MRC



Existe associação entre estas duas variáveis.

## Conclusões

- Os resultados obtidos com o presente trabalho reforçam a hipótese da disfunção mitocondrial como resultado de lesão oxidativa na MS.
- As variações do mtDNA estudadas conferem susceptibilidade para a doença (RR 3,8).
- Dado o papel central da mitocôndria em tantas funções celulares importantes, incluindo a produção de energia, é razoável que a sua disfunção seja um contributo chave no processo neurodegenerativo que ocorre na doença.
- Tratamentos neuroprotectores e dirigidos à mitocôndria, ou a combinação de neuroprotectores e imunomoduladores poderiam representar uma abordagem terapêutica mais racional na MS.

## Agradecimentos

