

Ao Francisco e ao Gabriel

Agradecimentos

Desejo expressar gratidão a todos quantos contribuíram para a concretização deste trabalho, em particular:

À minha orientadora, Professora Doutora Manuela Grazina quero expressar a mais profunda gratidão por tudo o que me tem transmitido ao longo destes anos, não só de trabalho científico e técnico, que me ajudaram a evoluir no meu conhecimento e trabalho, mas também pelo seu apoio e confiança.

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira estou grata pela oportunidade de realizar o trabalho laboratorial conducente a esta Dissertação.

À Doutora Maria do Carmo Macário quero expressar o meu agradecimento pela caracterização clínica dos indivíduos integrados neste estudo.

Aos meus amigos e colegas do Centro de Neurociências e Biologia Celular, agradeço toda a colaboração, disponibilidade e amizade, sem a qual este trabalho não teria sido concretizado, em especial à Marta Simões, ao João Pratas, à Maria João Santos, ao Miguel Oliveira, à Carla Veríssimo e também às pessoas que estão connosco mais recentemente e que tanto têm colaborado, à Daniela Luís, à Carolina Ribeiro, à Mónica Vaz, ao Michael Alves e à Catarina Pinto.

À D. Rosa Cardoso, à D. Virgínia, à Joana Cipriano e à Rosa Fernandes, agradeço toda a simpatia e colaboração que têm demonstrado ao longo destes anos.

À minha família e amigos estou grata pelo encorajamento e infinita paciência.

Por fim, uma palavra muito especial ao Francisco, por tudo, obrigada!

Índice de texto

		Página
1.	Introdução	1
1.1	Sistema nervoso central	2
1.2	A maquinaria mitocondrial como principal fonte de energia	5
1.2.1	Mitocôndria: fonte e alvo de espécies reactivas	9
1.3	A esclerose múltipla	14
1.4	Mecanismo molecular da inflamação	21
1.5	Stresse oxidativo e desmielinização	26
1.6	Disfunção da mitocôndria como causa da neurodegenerescência na MS	27
2	Materiais e métodos	34
2.1	Materiais	35
2.2	Amostragem	35
2.3	Métodos	36
2.3.1	Isolamento de linfócitos	36
2.3.2	Medição da actividade enzimática dos complexos da MRC	37
2.3.3	Complexo II	39
2.3.4	Complexo II+III e complexo III	39
2.3.5	Complexo IV	40
2.3.6	Citrato sintetase	40
2.3.7	Concentração de proteína	40
2.4	Critério de défice para a MRC	41
2.5	Análise estatística	41
3	Resultados e discussão	43

3.1	Análise bioquímica da MRC	44
3.1.1	Resultados	44
3.1.2	Discussão	47
3.2	Estudos genéticos	49
3.2.1	Resultados	49
3.2.1.1	Haplogrupos mitocondriais	50
3.2.1.2	Variações de sequência do mtDNA	52
3.2.2	Discussão	53
3.2.3	Correlação bioquímica - genética	53
3.2.4	Discussão	55
4	Conclusões	57
	Referências bibliográficas	59

Índice de figuras

	Página
Figura 1 - Sistema Nervoso Central	2
Figura 2 - Neurónio. Impulso nervoso num nervo normal e num nervo lesado	4
Figura 3 - Representação esquemática dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial e da via da fosforilação oxidativa	7
Figura 4 - Factores que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da MS	17
Figura 5 - Distribuição geográfica da Esclerose Múltipla no mundo	18
Figura 6 - Imunopatogenese da MS	24
Figura 7 - Anomalias mitocondriais em doentes com MS	28
Figura 8 - Fluxos iónicos axonais durante a transmissão do impulso nervoso. Sequência hipotética de eventos em situação: (a) normal; (b) de défice energético, com depleção de ATP	31
Figura 9 - Representação gráfica dos resultados da avaliação de défices da MRC nos doentes com MS	46
Figura 10 - Distribuição dos haplogrupos mitocondriais entre doentes MS controlos normais	51

Índice de tabelas

	Página
Tabela I - Caracterização dos doentes com MS.	44
Tabela II - Actividade enzimática específica para os complexos II, III, IV e segmento CII+III da MRC de controlos e doentes.	45
Tabela III - Actividade enzimática dos complexos II, III, IV e segmento CII+III da MRC, corrigidos para a CS.	45
Tabela IV - Resultados da avaliação dos défices específicos na actividade dos complexos da MRC, nos doentes com MS.	46
Tabela V - Caracterização dos doentes com MS.	49
Tabela VI - Frequência dos haplogrupos mitocondriais para controlos e doentes MS e análises estatística (teste exacto de Fisher).	50
Tabela VII - Frequência das variações de sequência do mtDNA para controlos e doentes MS e análise estatística pelo teste de Fisher.	52
Tabela VIII - Distribuição dos haplogrupos H e JT em doentes com MRC deficiente ou normal e análise estatística (teste exacto de Fisher)	54
Tabela IX – Distribuição de doentes com ou sem variações de sequência ao nível do mtDNA no grupo de doentes com MRC deficiente e normal	55

Abreviaturas

Abreviatura	Nome completo
ϵ	Coeficiente de extinção molar
λ	Comprimento de onda
$\Delta\Psi$	Potencial transmembranar mitocondrial
A	Absorvância
ADP	Adenosina difosfato
AIFs	Factores indutores da apoptose
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase	F1F0 ATP sintetase, complexo V da cadeia respiratória mitocondrial
BBB	Barreira hematoencefálica (<i>Blood-Brain Barrier</i>)
BMP	Proteína de mielina básica
BSA	Albumina plasmática bovina
c	Concentração da amostra
°C	Grau centigrado
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CNS	Sistema Nervoso Central (<i>Central Nervous System</i>)
COX	Citocromo c oxidase, complexo IV da MRC, EC1.9.3.1
CS	Citrato sintetase, EC 4.1.3.7
CSF	Líquido encefalorraquidiano (<i>cerebrospinal fluid</i>)
DCPIP	Diclorofenol indofenol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DTNB	Ácido 5'-ditiobis 2-nitrobenzoico

DUQH ₂	Decilubiquinol
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EDSS	Escala de Kurtzke ampliada (<i>Extended Disability Status Scale</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	sintetase do óxido nítrico endotelial
F	Feminino
FAD	Flavina-adenina dinucleotido
FADH ₂	Flavina-adenina dinucleotido reduzida
g	Unidade de força centrífuga
GSH	Glutatião reduzido
GSNO	S-nitrosoglutationa
G3P	Glicerol-3-fosfato
HLA	Antigénio leucocitário humano
HO·	Radical hidróxilo
H ₂ O miliQ	Água miliQ
I_0	Radiação incidente
I_t	Radiação transmitida
iNOS	Sintetase do óxido nítrico induzida
K_m	Constante específica da velocidade de reacção ou constante cinética
l	Percurso da radiação que atravessa a amostra
LCR	Líquido cefaloraquidiano
LFA-1	Antigénio-1 Associado a Função Leucocitária (<i>leucocyte function-associated antigene-1</i>)
LHON	Neuropatia óptica de Leber
LPO	Peroxidação lipídica

M	Masculino
MEM	Membrana externa mitocondrial
MIM	Membrana interna mitocondrial
MOG	Glicoproteína da mielina do oligodendrocitócito
MPT	Poros de transição mitocondrial
MRC	Cadeia respiratória mitocondrial (<i>mitochondrial respiratory chain</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MRS	Espectroscopia de ressonância magnética
MS	Esclerose múltipla
mtDNA	Genoma mitocondrial
n	Número de indivíduos
NAA	N-acetilaspártato
NAD	Nicotinamida-adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenina dinucleótido reduzida
nDNA	Genoma (DNA) nuclear
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Sintetase do óxido nítrico
NQR	NADH desidrogenase ou complexo I da MRC
O ₂ ^{·-}	Radical superóxido
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PBS	Solução salina de tampão fosfato (phosphate-buffered saline)
PLP	Proteína proteolípida
PNS	Sistema Nervoso Periférico (<i>Peripheral Nervous System</i>)
PON	Neurite óptica proeminente
QCR	Ubiquinol citocromo c reductase, complexo III da MRC, EC1.10.2.2

RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossómico (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
RNS	Espécies reactivas de nitrogénio
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RRMS	Fase recorrente-remitente (<i>relapsing-remitting</i>)
SD	Desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
SDH	Succinato desidrogenase, complexo II da MRC, EC1.6.5.1
SOD	Superoxido dismutase
SPMS	Fase progressiva secundária da MS
tRNA	Ácido ribonucleico de transferência (<i>transfer ribonucleic acid</i>)
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TNF α	Factor de necrose tumoral alfa
UV	Ultra-violeta
VIS	Visível
VLA-4	Antigénio-4 Muito Tardio (<i>very late antigen-4</i>)

Abstract

Multiple sclerosis is a neurological, autoimmune disorder of the Central Nervous System, which involves the immune system. It is characterized by demyelisation and neurodegeneration. Major pathological characteristics include the loss of oligodendrocytes, demyelisation and neuroaxonal depletion in association with inflammation and possibly mitochondrial dysfunction.

Onset of multiple sclerosis typically occurs during early adulthood and can develop in an episodic fashion with phases without clinical manifestations followed by clinical disease called “relapsing-remitting” multiple sclerosis. Over time, patients may develop chronic lesions that promote irreversible axonal injury, resulting in a secondary progressive multiple sclerosis. This phase is characterized by minimal or no intermittent recovery.

Clinical presentation of multiple sclerosis is heterogeneous, principal symptoms include impaired vision, extreme fatigue, spasms and paralysis of a variety of muscles. Multiple sclerosis affects more than 2 million people all over the world.

Several authors refer multiple sclerosis as an inflammatory autoimmune disease mediated by specific T-cells sensitization against putative myelin antigens of the Central Nervous System. Immune-mediated loss of myelin and mitochondrial dysfunction have been also associated with the disease.

The present work focuses on the functional involvement of mitochondrion, particularly the process of oxidative phosphorylation, on the development of multiple sclerosis lesions. That intracellular organelle plays a central role in the energy metabolism and homeostasis of the cell. Mitochondrial respiratory chain dysfunction

may be a cause or a consequence of mitochondrion lesions, such as mitochondrial DNA, protein or lipids oxidation or even mitochondrial pore transition impairment, which has been associated with neurodegeneration and cell death.

The main goals of this work are: i) analyse the involvement of the mitochondrial respiratory chain in multiple sclerosis ii) investigate the correlation of these data with mtDNA molecular genetics studies.

This work involves the spectrophotometric evaluation of the enzymatic activity of the mitochondrial respiratory chain complexes II, III and IV, as well as the mitochondrial marker citrate synthase, in isolated lymphocytes from peripheral blood from multiple sclerosis patients followed in Neurology Department of the *Hospitais da Universidade de Coimbra* and a control group without any known degenerative disease.

The results obtained put in evidence an impairment of oxidative phosphorylation, particularly in complex IV, in 48% of the patients affected with multiple sclerosis investigated.

Biochemical data were analysed in correlation with genetic information available in our laboratory, for the same patients. It was observed that there is no association with mitochondrial genome haplogroups, but we have found a statistically significant difference for the correlation of mitochondrial respiratory chain deficiencies, with mtDNA alterations found in patients groups.

Our data suggest that mtDNA and mitochondrial dysfunction play an important role in pathogenesis of multiple sclerosis, supporting some results available in literature and giving a novel contribution concerning mitochondrial respiratory chain complexes activity in cells derived from patients affected with that pathology.

Resumo

A Esclerose Múltipla é uma doença do Sistema Nervoso Central, que envolve o sistema imunitário e que se caracteriza por desmielinização e neurodegenerescência. As principais características neuropatológicas são a perda de oligodendrócitos, desmielinização, diminuição neuroaxonal associada à inflamação e, possivelmente, à disfunção mitocondrial. O início da doença ocorre geralmente no início da vida adulta e o curso da doença agrava-se com o tempo, podendo ocorrer períodos sem manifestações clínicas (remissões), que alternam com surtos da doença (exacerbações), que se denomina por *relapsing-remitting*. Com o decorrer do tempo, os doentes podem desenvolver lesões crónicas, que promovem a lesão axonal irreversível, daqui resultando que a fase *relapsing-remitting* evolui para uma fase secundária progressiva, que é caracterizada por não haver recuperação ou recuperação mínima. A apresentação clínica é heterogénea, os principais sintomas incluem alteração da visão, fadiga extrema, espasmos e paralisia de vários músculos. Esta doença afecta mais de dois milhões de pessoas em todo o mundo.

É geralmente aceite na literatura que a Esclerose Múltipla é uma doença inflamatória auto-imune, mediada por células T específicas, que reagem contra a mielina do Sistema Nervoso Central, levando à sua perda, que, em conjunto com a disfunção mitocondrial poderá estar na origem da doença.

O presente trabalho foca-se no envolvimento funcional da mitocôndria, em particular do processo de fosforilação oxidativa, no desenvolvimento das lesões nesta doença, uma vez que este organelo intracelular desempenha um papel central no metabolismo energético e na homeostase da célula. A disfunção da cadeia respiratória mitocondrial poderá ser a causa ou a consequência de lesões na mitocôndria, tais como

a oxidação de DNA mitocondrial, de proteínas e lípidos, ou alterações ao nível do poro de transição mitocondrial, um fenómeno que tem sido associado à neurodegenerescência e morte celular.

Os objectivos deste estudo são: i) analisar o envolvimento da disfunção da cadeia respiratória mitocondrial na Esclerose Múltipla; ii) investigar a correlação destes dados com os estudos de genética molecular do mtDNA.

O presente trabalho envolve a avaliação espectrofométrica da actividade enzimática dos complexos II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, bem como da enzima marcadora mitocondrial citrato sintetase, em linfócitos isolados a partir de sangue periférico, proveniente de doentes, afectados com Esclerose Múltipla, seguidos no Serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, em comparação com um grupo controlo.

Os resultados obtidos evidenciam um défice da fosforilação oxidativa em 48% dos doentes com esclerose múltipla investigados, maioritariamente do complexo IV.

Os dados bioquímicos foram analisados em correlação com a informação genética existentes no laboratório, para os mesmos doentes. Verificou-se que não há associação com os haplogrupos do gene mitocondrial, mas encontrámos uma diferença estatisticamente significativa para a correlação dos défices da cadeia respiratória mitocondrial com as alterações do mtDNA investigadas no grupo dos doentes.

Os nossos dados sugerem que o mtDNA e a disfunção mitocondrial desempenham um papel importante na patogenia de esclerose múltipla, reforçando alguns dados já existentes na literatura e dando um novo contributo no que diz respeito à actividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em células de doentes com aquela patologia.

Palavras-chave

Cadeia respiratória mitocondrial

Doenças neurodegenerativas

Esclerose múltipla

Fosforilação oxidativa

Genoma mitocondrial

Haplogupo

Mitocôndria

mtDNA