REVISÃO ISSN 0871-3413 • ©*ArquiMed*, 2008

Cadeia Respiratória Mitocondrial

Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Défice do Complexo I

Mariana Ferreira, Tatiana Aguiar, Laura Vilarinho
Laboratório de Investigação, Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães, INSA

As citopatias mitocondriais constituem um grupo heterogéneo de doenças que se caracterizam por alterações da estrutura mitocondrial e deficiência da fosforilação oxidativa (OXPHOS).
A OXPHOS é constituída por cinco complexos proteicos e dois transportadores de electões. A NADHubiquinona oxidoreductase – complexo I, o primeiro e maior dos cinco complexos é o principal ponto de entrada de electrões, provenientes do ciclo de Krebs, no sistema OXPHOS.
Os défices do complexo I são um diagnóstico relativamente frequente de citopatia mitocondrial, sendo causados por mutações no DNA mitocondrial ou no DNA nuclear. Devido a este controlo genético duplo, que contribui para a complexidade do sistema OXPHOS, defeitos no complexo I resultam numa variedade de fenótipos clínicos, que estão geralmente associados a disfunções metabólicas graves da infância, incluindo cardiomiopatia progressiva, encefalomiopatia, leucodistrofia ou síndrome de Leigh. Na investigação dos mecanismos subjacentes aos défices do complexo I, são utilizados vários modelos, tais como a *Neuropora crassa* e os *cíbridos*, que conjuntamente com o uso de novas ferramentas bioquímicas (*Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis*), revelam-se de extrema importância para o processo.
Perante a complexidade deste sistema enzimático, quer estrutural como na sua manutenção, é difícil efectuar um diagnóstico molecular na rotina laboratorial. Em Portugal, o estudo destes pacientes tem sido restrito à medição da actividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória e pesquisa das mutações pontuais mais comuns e rearranjos do mtDNA, até há alguns meses atrás. Como consequência a maioria dos casos de défices do complexo I continuam por esclarecer sob o ponto de vista molecular, tornando-se assim indispensável avançar para uma investigação mais abrangente, possibilitando desta forma um aconselhamento genético adequado e um diagnóstico pré-natal para as famílias de risco.
Palavras-chave: OXPHOS; complexo I; mtDNA; nDNA; CRM; citopatias mitocondriais.

ARQUIVOS DE MEDICINA, 22(2/3):49-56

INTRODUÇÃO

A mitocôndria é um organelo intracelular existente na maioria das células eucarióticas, desempenhando um importante papel na produção de ATP celular. A mitocôndria está envolvida na homeostasia celular, tendo um importante papel na sinalização intracelular, apoptose, metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteróides e nucleótidos. Contudo, a sua principal função é no metabolismo energético, nomedamente, β-oxidação dos ácidos gordos, ciclo da ureia e na via final comum de produção de ATP – cadeia respiratória.

Os componentes da cadeia respiratória localizam-se na membrana interna da mitocôndria sob a forma de quatro complexos proteína-lípidos, o complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase EC 1.6.5.3) com mais de 40 polipéptidos, o complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase EC 1.3.5.1), o complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase EC 1.10.2.2) e finalmente o complexo IV (citocromo c oxidase EC 1.9.3.1) (Figura 1). A CRM possui ainda dois transportadores de electrões, ubiquinona e citocromo *c*. Estes constituintes bem como o complexo V, ATP sintetase, formam o sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS), que fornece o ATP necessário à célula.

A função global da cadeia respiratória é a oxidação de nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleótido reduzida (FADH2), provenientes de outras vias metabólicas, bem como o transporte de equivalentes reduzidos ao longo de uma série de transportadores para o aceitador final, o oxigénio. Os complexos I, III e IV funcionam como uma bomba de protões. Estes acumulam-se no espaço intermembranar, criando uma diferença de potencial electroquímico, utilizado pela ATP sintase na formação de ATP, a partir de ADP e P_i. A velocidade da respiração mitocondrial pode

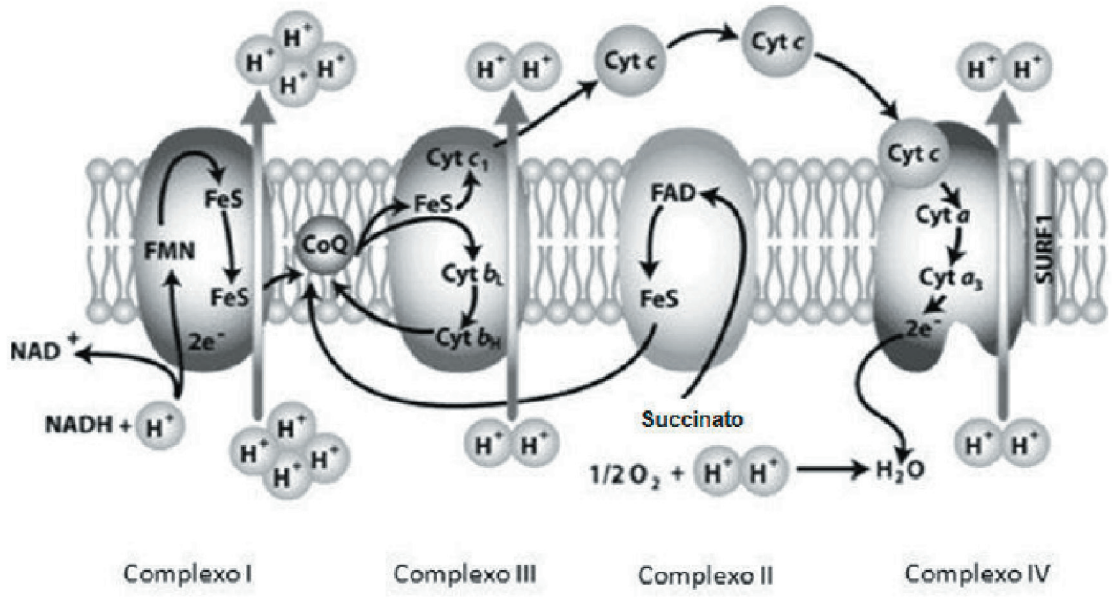


Fig. 1 - Representação esquemática dos complexos da Cadeia Respiratória Mitocondrial. Complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase EC 1.6.5.3); complexo II (succinato-ubiquinona oxidoreductase EC 1.3.5.1); complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase EC 1.10.2.2) e complexo IV (citocromo c oxidade EC 1.9.3.1).

ser controlada pela disponibilidade de ADP.

O sistema OXPHOS, sendo o mecanismo final de todas as vias metabólicas para a produção de energia, procede à sua regulação e portanto qualquer défice na CRM tem consequências nesse sistema.

A actividade do ciclo de Krebs é regulada pela razão NAD/NADH, que por sua vez está dependente da disponibilidade de ADP e este da utilização do ATP. Adicionalmente, algumas enzimas do ciclo são também reguladas, como é o caso, por exemplo, da citrato sintetase que é inibida alostericamente pelo ATP e acil-CoA de cadeia longa e da isocitrato desidrogenase que é activada pelo ADP e inactivada pelo ATP e NADH. A succinato desidrogenase é inibida pelo oxaloacetato, e a sua disponibilidade é controlada pela malato desidrogenase, que depende da razão NADH/NAD.

Assim no caso de existir um défice na CRM, o NADH não vai ser oxidado a NAD^+ e consequentemente este não vai estar disponível para o ciclo de Krebs, levando à acumulação dos seus metabolitos intermediários.

As citopatias mitocondriais são um grupo de doenças multissistémicas de expressão clínica heterogénea que têm na sua origem alterações do metabolismo energético celular causadas pela disfunção de um ou mais complexos enzimáticos do sistema OXPHOS.

Estas doenças atingem principalmente o sistema nervoso central, o músculo esquelético ou ambos, sendo por conseguinte na grande maioria encefalomiopatias. Outros órgãos, como o coração, fígado, pâncreas, olho e rim podem também ser afectados, levando a um complexo espectro de manifestações clínicas.

O aparecimento dos primeiros sintomas pode ocorrer em qualquer idade, podendo ser progressivamente lentos, rápidos ou até fatais (1). Embora não exista um tratamento específico para este tipo de doenças, têm sido utilizados tratamentos sintomáticos, que melhoram a qualidade de vida destes doentes (2, 3).

A marca histológica das miopatias mitocondriais são as RRFs (*ragged red fibers*) demonstradas através da coloração de Tricrómio de Gomori modificado (Figura 2).

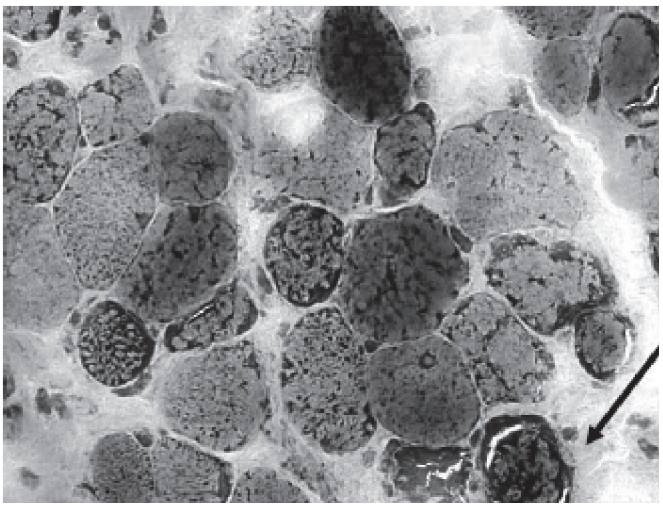


Fig. 2 - Corte histológico onde podem ser visualizadas RRFs (ragged red fibers), coradas com o corante de tricrómio de Gomori modificado. (http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/pathol/mitochondrial.htm).

A alteração das fibras musculares normais para RRFs é devida à acumulação sub-sarcolémica de mitocôndrias anormais quer em número quer em tamanho. Apesar da importância da presença de RRFs no diagnóstico das citopatias mitocondriais, a sua ausência não exclui este tipo de diagnóstico, principalmente nas crianças. São também efectuados estudos bioquímicos que permitem identificar defeitos na CRM.

Contudo, tornou-se evidente que apenas estes estudos não são suficientes para classificar este grupo de doenças tão heterogéneo. Actualmente recorre-se ao estudo molecular do DNA mitocondrial (mtDNA) para detecção de mutações, bem como ao *Southern Blotting* para detecção de rearranjos, tais como delecções simples de grande tamanho ou delecções múltiplas.

COMPLEXO I

As citopatias mitocondriais são as doenças hereditárias do metabolismo mais frequentes e segundo a literatura o défice do complexo I é o mais comum.

O complexo I é constituído por um grande número de proteínas (46 subunidades nos mamíferos), com origem genética dupla – nuclear e mitocondrial, sendo sete destas subunidades (ND1-ND6, ND4L) codificadas por genes mitocondriais (Figura 3) e as restantes codificadas por DNA nuclear (nDNA).

Contém uma flavina mononucleótido (FMN) e centros ferro-enxofre [Fe-S] como grupos prostéticos.

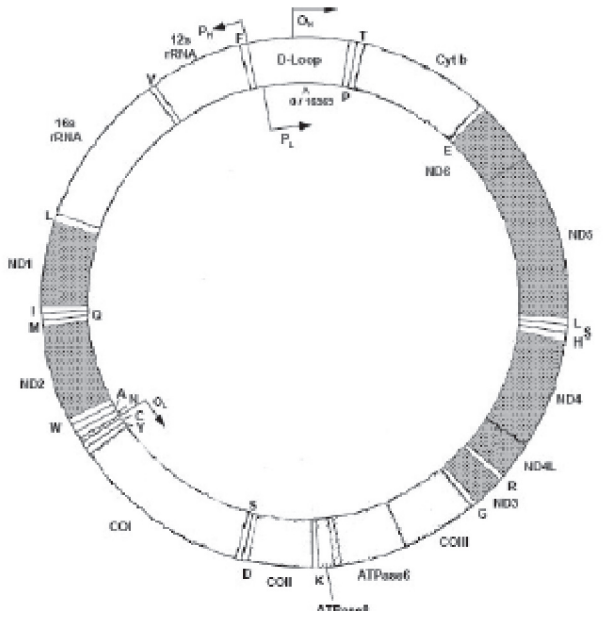


Fig. 3 - Representação esquemática do genoma mitocondrial (mtDNA), onde se encontram assinalados a cinzento os 7 genes codificantes para subunidades do complexo I - MTND1-MTND6, MTND4L (adaptado de http://www.mitomap.org).

Este complexo contribui significativamente para a produção de energia na mitocôndria, catalizando o primeiro passo da cadeia respiratória mitocondrial, no qual ocorre a oxidação de NADH, usando a ubiquinona (Q) como aceitador de electrões. A transferência de dois electrões é acompanhada pela translocação de quatro protões (H^+) da matriz para o espaço intermembranar, criando um gradiente protónico que é utilizado para a síntese de ATP (4).

$NADH + H^+ + Q + 4H^+$ matriz → $NAD^+ + QH_2 + 4H^+$ espaço intermembranar

Os dois electrões fornecidos pela oxidação do NADH são transferidos, via FMN (aceitador de electrões primário do complexo I), para uma cadeia de clusters [Fe-S], pela seguinte sequência N3-N1b-N4-N5-N6a-N6b-N2. Pensa-se que a subunidade 49 KDa, que contém o *cluster* N2 esteja envolvida na ligação da ubiquinona. De acordo com as observações mais recentes, sete dos oito *clusters* Fe-S participam na cadeia transportadora de electrões do complexo I, porém o *cluster* N1a encontra-se afastado, o que leva a crer que é pouco provável a sua participação directa no transporte de electrões. Contudo, devido à localização do N1 próximo da FMN, pensa-se que possa estar envolvido na prevenção do excesso de redução de FMN, redistribuindo os electrões pela cadeia de transporte. Os electrões são depois transferidos para o aceitador final – ubiquinona, que é então reduzida a ubiquinol (QH_2).

O primeiro centro redox é um *cluster* tetranuclear N3 localizado na metaloproteína 51 kDa (NDUFV1), que também contém o aceitador primário de electrões – FMN e o local de ligação do NADH. Os *clusters* N1b, N4, N5 e N7 localizam-se na subunidade 75 kDa (NDUFS1), o cluster N6a e N6b localizam-se na subunidade TYKY (NDUFS8) e o último *cluster* da cadeia – N2 encontra-se na subunidade PSST (NDUFS7). O *cluster* N1a localiza-se na subunidade de 24 kDa (NDUFV2) (4).

Devido à sua complexidade e à falta de estruturas 3D cristalográficas de alta resolução, pouco se sabe acerca de estrutura do complexo I. Contudo tem sido aceite, com os dados de estruturas 3D de baixa resolução que o complexo I tem uma estrutura cuja forma se assemelha a um L, tal como tem sido demonstrado para a enzima da *Neurospora crassa*, *Yarrowia lipolytica*, *Esherichia coli* e mitocôndria do coração do bovino. Esta estrutura é constituída por dois braços perpendiculares entre si: um braço hidrofóbico embebido na membrana lipidica e um hidrofílico, braço periférico protuberante para a matriz (Figura 4).

Existem 14 subunidades essenciais para a catálise da transferência de electrões do NADH para a ubiquinona e para a formação do potencial de membrana. Metade das subunidades são codificas pelo DNA nuclear, sendo as mais conservadas entre as subunidades eucariotas (NDUFS1-3, NDUFS7-8, NDUFV1-2), constituindo o domínio periférico que compreende todos os centros redox e o local de ligação do substrato NADH. As restantes sete subunidades (ND1-6, ND4L) são codificadas pelo mtDNA, formando o domínio membranar. Supõem-se

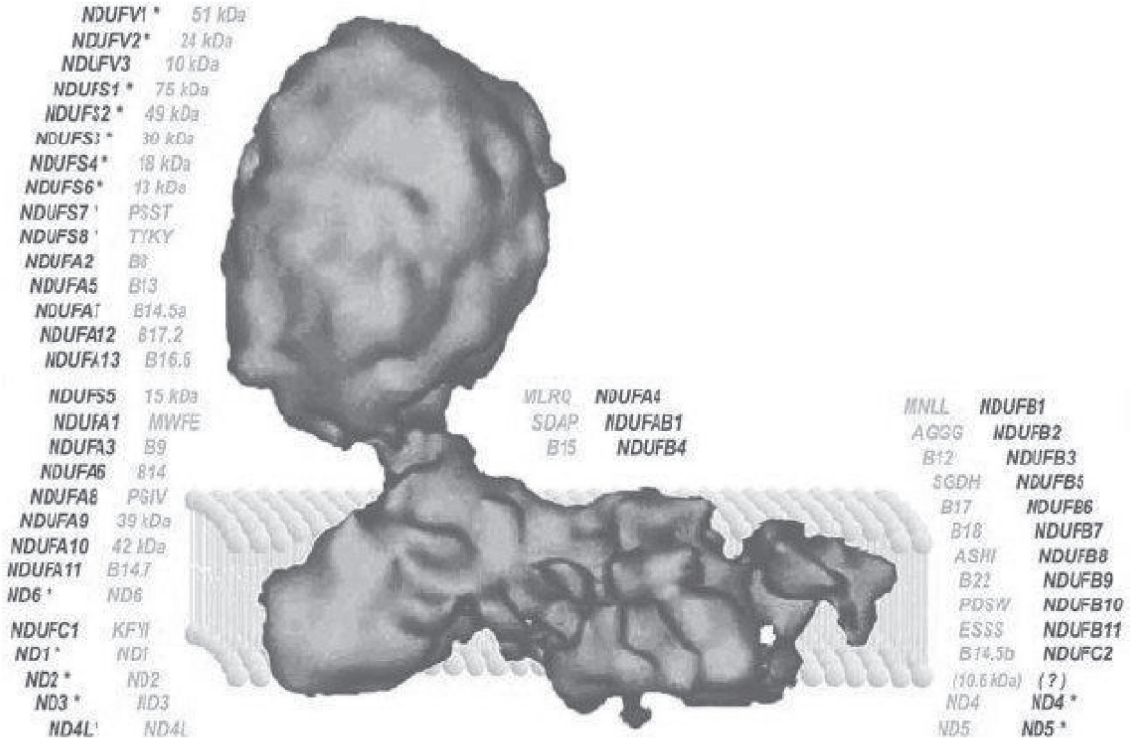


Fig. 4 - Representação esquemática do complexo I dos mamíferos, onde se encontram representados os genes humanos (escuro) e os respectivos genes homólogos bovinos.

que as subunidades ND2, ND4 e ND5 fazem parte da maquinaria de translocação de protões. A subunidade ND1 possui um local de ligação da quinona, propondo-se assim que possa estar relacionada com a ligação da ubiquinona.

Está descrito que o papel das 32 subunidades acessórias no complexo I está relacionado com o aumento de estabilidade estrutural ao manter os grupos redox na posição correcta e protecção da enzima dos radicais livres de oxigénio. Podem também estar implicadas na regulação da actividade ou processamento do complexo I.

Aspectos clínicos

Devido à acção concertada dos genomas mitocondrial e nuclear na complexidade do sistema

OXPHOS, defeitos neste sistema resultam numa variedade de fenótipos clínicos. Podem observar-se também vários tipos de hereditariedade, desde a hereditariedade materna, autossómica dominante ou recessiva, ligada ao X ou esporádica. No que diz respeito às mutações no mtDNA, na maioria dos casos, não se observa uma correlação genótipo-fenótipo, dado que diferentes mutações podem resultar em fenótipos semelhantes ou as mesmas mutações podem levar a fenótipos clínicos distintos.

As deficências do complexo I estão associadas a um grupo heterogéneo de doenças. Fenótipos clínicos causados por mutações nucleares estão geralmente presentes no lactente e primeira infância, enquanto que aqueles associados a mutações mitocondriais estão presentes na segunda infância e adolescência.

LHON (*Leber hereditary optic neuropathy*) e MELAS (*mitochondrial encephalopathy lactic acidosis stroke-like episodes*) são dos síndromes mais comummente associados a défices do complexo I causados por mutações mitocondriais (5, 6).

Os fenótipos clínicos descritos associados a mutações nucleares dividem-se em cinco categorias: acidose láctica infantil fatal, síndrome de Leigh, cardiomiopatia neonatal com acidose láctica, leucodistrofia com macrocefalia e hepatopatia com tubulopatia renal. Existe ainda um grupo adicional que engloba encefalomiopatias inespecíficas que apresentam sintomas neuromusculares e que não podem ser incluídas em nenhum fenótipo específico (4, 7).

Aspectos bioquímicos

A abordagem bioquímica das citopatias mitocondriais engloba os doseamentos de lactato (L) e piruvato (P) sanguíneos, assim como a respectiva razão molar (L/P). Uma alteração da OXPHOS pode provocar um bloqueio do ciclo de Krebs devido ao excesso de NADH ou falta de NAD^+, aumentando os níveis de lactato e de piruvato. Assim, uma hiperlactacidemia e uma razão L/P superior a 25 podem ser um indicativo de citopatia mitocondrial (8).

Podem também ser efectuadas determinações dos corpos cetónicos sanguíneos, 3-hidroxibutirato (3OHB) e acetoacetato (AA), e respectiva razão molar (3OHB/AA), onde um aumento de qualquer um destes parâmetros é um factor importante no diagnóstico já que reflectem o não consumo de acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico e a sua consequente canalização para a cetogénese. Em caso de citopatia mitocondrial é provável a obtenção de um perfil anormal de ácidos orgânicos urinários obtido por cromatografia gasosa / espectrometria de massa (GC/MS), nomeadamente um aumento de excreção dos ácidos: láctico, 3-metilglutacónico, etilmalónico, 2-etilhidracrílico, metabolitos do ciclo de Krebs (ácidos fumárico, succínico e málico) e corpos cetónicos (3OHB e AA). Pode-se também obter um perfil anormal dos aminoácidos plasmáticos – aumento de alanina (hiperalaninemia) e/ou urinários (hiperaminoaciduria generalizada) (8).

Aspectos miopatológicos

Na maioria dos casos em que há suspeita de citopatia mitocondrial procede-se a biópsia muscular, que deve ser conservada em azoto líquido ou neve carbónica. A marca histológica das miopatias mitocondriais são as *ragged red fibers* (RRFs), como foi referido anteriormente. São usadas várias colorações histoquímicas / histoenzimáticas específicas para as enzimas oxidativas (citocromo c oxidase - COX, succinato desidrogenase - SDH, entre outras) com o objectivo de analisar a distribuição das mitocôndrias e verificar a sua actividade enzimática.

A suspeita de citopatia mitocondrial é equacionada nos músculos em que se observaram mais de 3% de RRFs por fragmento, mais de 3% de fibras com ausência de actividade COX (fibras COX negativas), um aumento da actividade da SDH e presença de inclusões paracristalinas (observadas por microscopia electrónica).

Aspectos enzimáticos

As disfunções da cadeia respiratória mitocondrial podem ser investigadas através da determinação da actividade enzimática dos diversos complexos por espectrofotometria, avaliando assim o défice da cadeia respiratória mitocondrial (CRM).

Os estudos espectrofotométricos consistem em ensaios com enzimas respiratórias isoladas ou combinadas, baseando-se na transferência dos equivalentes reduzidos cedidos por substratos naturais ou artificiais (NADH, succinato, coenzima Q, citocromo c, ascorbato). Não requerem o isolamento de fracções mitocondriais e podem ser realizados em homogeneizados de tecido. Por esta razão, a quantidade de material requerida é muito pequena e pode ser facilmente derivada de uma amostra de biópsia de músculo (50 – 100 mg), fígado, rim e miocárdio ou de um *pellet* de linfócitos. No entando este estudo deve ser efectuado preferencialmente em biopsia de músculo.

É efectuada a determinação individualizada da actividade dos complexos I, II, III e IV e conjunta dos complexos II e III da CRM. Através da utilização de inibidores específicos adequados para cada um dos complexos, são eliminadas as interferências devido às actividades inespecíficas. A actividade da enzima citrato sintetase (CS) – enzima do ciclo de Krebs, é determinada simultaneamente com os restantes doseamentos, sendo utilizada como controlo de qualidade da amostra e do seu estado de conservação. Os resultados são calculados em função da actividade das proteínas presentes no músculo e referidos à actividade da enzima de referência, CS.

A determinação da actividade do complexo I baseia-se na redução da coenzima Q (decilubiquinona) pelo NADH, sendo feita na presença e ausência de rotenona, que é um inibidor deste complexo.

Aspectos moleculares

As deficiências do complexo I são uma das causas mais comuns das citopatias mitocondriais (7, 9).

Dada a complexidade das enzimas do sistema de fosforilação oxidativa, tanto na estrutura como na manutenção, nem sempre é fácil obter um diagnóstico molecular devido ao elevado número de genes envolvidos. Deficências do complexo I podem ser causadas por mutações quer no mtDNA quer no nDNA.

A investigação molecular passa pela extracção de DNA a partir de sangue ou biópsia muscular (quando existente é o material mais adequado para a identificação de mutações no mtDNA). A técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), seguida de sequenciação directa dos genes que codificam para subunidades do complexo I é a estratégia utilizada para a pesquisa de mutações. A abordagem genética deste estudo deve iniciar-se pela pesquisa das mutações mais comuns e delecções de grande tamanho do mtDNA (3243A >G, 3271T>C, 8344A >G, 8356T>C, 8993T>C/G) (5, 10, 11). Seguidamente estudam-se os sete genes mitocondriais (*MTND1-MTND6, MTND4L*) e posteriormente, são sequenciados os onze genes nucleares onde até à data foram descritas mutações – *NDUFS1*, *NDUFS2*, *NDUFS3*, *NDUFS4*, *NDUFS6*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, *NDUFV1*, *NDUFV2*, *NDUFA1* e *NDUFA8*. Se todo o estudo for negativo pode ainda efectuar-se a pesquisa de mutações nos genes *B17.2L* e *NDUFAF1* (*CIA30*), que codificam para factores de processamento do complexo I, bem como em genes que codificam para subunidades onde não foram ainda descritas mutações.

Actualmente estão descritas 46 mutações no nDNA em 10 genes que codificam subunidades do complexo I e três mutações em genes codificantes dos factores de processamento (Tabela 1), e ainda cerca de 43 mutações patogénicas no mtDNA (12).

Mutações nos genes nucleares *NDUFS1*, *NDUFS4*, *NDUFS7*, *NDUFS8*, e *NDUFV1* resultam em doenças neurológicas, maioritariamente síndrome de Leigh. Por outro lado, mutações nos genes *NDUFS2* e *NDUFV2* estão associados a cardiomiopatia hipertrófica e encefalomiopatia. Alterações nos genes mitocondriais estão associadas a uma grande variedade de sintomas, que podem envolver

Tabela 1 - **Mutações nucleares associadas ao défice do complexo I, já descritas, e respectivos fenótipos clínicos.**

Gene	Genótipo	Fenótipo Clínico	Referência
NDUFS1	L231V	Síndrome de Leigh	17
	R241W/R557X	Síndrome de Leigh	18
	D252G/del codão 222	Leucodistrofia	18
	Q522K	Leucoencefalopatia. Regressão psicomotora, evoluindo para uma tetraparésia espástica	19
	M707V/deleção de grande escala	Síndrome de Leigh	18
NDUFS2	A224V	Encefalomiopatia	19
	(NDUFA8: E109K)	Hipotonia neonatal, características dismórficas, epilepsia e envolvimento neurológico	
	R228Q P229Q S413P	Cardiomiopatia hipertrófica e encefalomiopatia	20
NDUFS3	T145I/R199W	Síndrome de Leigh	21
NDUFS4	IVSnt-1	Síndrome de Leigh	22
	W15X	Leigh-like syndrome	23
	W96X	Leigh-like syndrome	24
	R106X	Leigh-like syndrome	24
	L158fs (duplicação de 5 pb)	Síndrome de Leigh	25
NDUFS6	IVS2nt+2 / Deleção de grande escala	Doença mitocondrial infantil fatal	26
NDUFS7	V122M	Síndrome de Leigh	27
	R145H	Síndrome de Leigh	28
	c.17-1167 C>G	Síndrome de Leigh	29
NDUFS8	R18C/P79L	Encefalomiopatia	30
	P79L/R102H	Síndrome de Leigh	31
	P85L/R138H	Síndrome de Leigh de revelação tardia	32
NDUFV1	R59X/T423M	Encefalomiopatia	33
	Y204/C206G	Síndrome de Leigh	18
	A211V	Hipotonia muscular e nistagmus	34
	E214L/IVS8nt+4	Síndrome de Leigh	18
	A341V	Leucodistrofia e epilepsia mioclónica	33
		Leucoencefalopatia	19
	A432P/Del nt 989-990	Síndrome de Leigh	18
NDUFV2	IVS2+5_+8del1GTAA	Cardiomiopatia hipertrófica e encefalomiopatia	35
NDUFA8	E109K	Encefalomiopatia	
	(NDUFS2: A224V)	Hipotonia neonatal, características dismórficas, epilepsia e envolvimento neurológico	19
NDUFA1 (ligado ao X)	G8R	Síndrome de Leigh	36
	R37S	Epilepsia mioclónica: atraso de desenvolvimento	
B17.2L	R45X	Encefalopatia progressiva. Características semelhantes a leucoencefalopatia com "vanishing white matter"	37
NDUFAF1	T207P/K253R	Cardiomiopatia hipertrófica, atraso de desenvolvimento, hipotonia e acidose láctica, cifoscoliose, perda de visão	38

um único órgão ou serem multissistémicas.

Aspectos funcionais

No aspecto funcional, o estudo dos défices do complexo I pode ter diferentes abordagens, desde técnicas bioquímicas até modelos eucarióticos.

O BN-Page (*Blue Native Polyacrylamide gel electrophoresis*) é uma técnica bioquímica desenvolvida para análise de proteínas de membrana. Associada à coloração histoquímica, esta técnica permite a análise e caracterização dos complexos enzimáticos da CRM, nomeadamente a integridade dos mesmos (13).

A origem mitocondrial do defeito enzimático pode ser demonstrada utilizando a técnica de transferência de hibridos citoplasmáticos, mais conhecida, por cíbridos (14). Estes são linhas celulares eucarióticas produzidas pela fusão de células enucleadas com células desprovidas do seu próprio mtDNA (*rho-zero*). Assim, um cíbrido é uma célula híbrida que combina o genoma nuclear de uma fonte com o genoma mitocondrial de outra, permitindo dissociar a contribuição genética do genoma mitocondrial do genoma nuclear.

As alterações nucleares podem ser estudadas recorrendo ao organismo mais extensivamente utilizado para o estudo da biogénese do complexo I - fungo aeróbio *Neurospora crassa*. O complexo I deste fungo é muito similar ao de mamíferos e, actualmente, é o único organismo eucariótico em que é possível fazer experimentação genética e bioquímica avançada, no que diz respeito a esta enzima, fazendo dele um modelo de extrema importância para o estudo do complexo I (15, 16).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na nossa casuística, os défices da CRM mais frequentes estavam associados ao complexo IV, contrariamente a outros estudos, que referem o défice do complexo I como sendo o mais comum (10).

De 1500 biópsias musculares investigadas nos últimos dez anos, só cerca de 1 % apresentavam um défice isolado do complexo I e 1,3% dos casos défices combinados, em que o complexo I estava envolvido. Destes casos apenas em aproximadamente 18 % dos défices isolados e 37% dos défices combinados foi possível identificar a mutação patogénica causal desta doença, com a estratégia utilizada há alguns anos, neste centro, para o estudo de delecções e mutações mais comuns do mtDNA.

Atendendo ao número de casos ainda sem diagnóstico molecular, tornou-se urgente avançarmos para uma investigação mais abrangente, de forma a caracterizar um maior número de doentes. Assim, será possível oferecer um aconselhamento genético adequado e um diagnóstico pré-natal molecular às famílias de risco, uma vez que não existe um tratamento efectivo destas patologias.

A investigação dos défices do complexo I é de elevada complexidade devido ao grande número de subunidades que o compõem, dificultando assim a caracterização molecular destes doentes.

Presentemente procedemos ao estudo dos genes mitocondriais *MTND1-MTND6*, *MTND4L*, bem como dos genes nucleares referidos anteriormente, onde já foram identificadas mutações. Contudo, está descrito que em cerca de 60% dos doentes não foram encontradas mutações em nenhum destes genes, o que sugere que factores envolvidos no processamento e manutenção do complexo I sejam também relevantes na etiologia da doença. Nesta conformidade, pretendemos alargar o estudo aos genes, já conhecidos, que codificam para factores de processamento (*NDUFAF1* e *B17.2L*), assim como aos que codificam para subunidades do complexo I, e nos quais não foram descritas mutações até à data.

Esperamos que esta investigação mais aprofundada permita aumentar o número de doentes com diagnóstico definitivo, bem como contribuir de forma valiosa para um melhor conhecimento da história natural destas patologias numa perspectiva mundial.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmentre financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (SFRH/BD/28197/2006).

REFERÊNCIAS

1 - Graff C, Bui T, Larsson N. Mitochondrial diseases. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2002;16:715-28.
2 - DiMauro S, Andreu A. Mutations in mtDNA: Are We Scraping the Bottom of the Barrel? Brain Pathol 2000;10:431-41.
3 - Chinnery PF, Turnbull DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. Am J Med Genet 2001;106: 94-101.
4 - Janssen R, Nijtmans L, van den Heuvel L, Smeitink J. Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology. J Inherit Metab Dis 2006;29:449-515.
5 - Vilarinho L, Santorelli FM, Coelho I, ET AL. The mitochondrial DNA A3243G mutation in Portugal:clinical and molecular studies in 5 families. J Neurol Sci,1999;163: 168-74.
6 - Santorelli FM, Tanji K, Kulikova R, at al.Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. Biochem Biophys Res Commun 1997;238:326--8.
7 - Loeffen JL, Smeitink JA, Trijbels JM, et al.Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects.Hum Mutat 2000;15:123-34.
8 - Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta 1994;228:35-51.
9 - Smeitink J, Sengers R, Trijbels F, van den Heuvel L, Human NADH:ubiquinone oxidoreductase. J Bioenerg Biomembr 2001;33:259-66.
10 - Vilarinho L, Cardoso M, Coelho T, Matos I, Coutinho P, Guimarães A. Estudo das Citopatias Mitocondriais – Parte II – Revisão de 30 Doentes. Arq Med 1997;11:160-6.

11 - Almeida E, Loureiro H, Almeida H, Machado M, Cabral A, Vilarinho L. Síndrome de Pearson. Caso Clínico. Acta Pediatr Port 2007;38:79-81.
12 - MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. http://www.mitomap.org, 2008.
13 - Nijtmans L, Henderson N, Holt I. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. Methods 2002;26:327-34.
14 - Jun A, Trounce I, Brown M, Shoeffner J, Wallace D. Use of Transmitochondrial Cybrids to Assign a Complex I Defect to the Mitochondrial DNA-Encoded NADH Dehydrogenase Subunit 6 Gene Mutation at Nucleotide Pair 14459 That Causes Leber Hereditary Optic Neuropathy and Dystonia. Mol Cell Biol 1996;16:771-7.
15 - Videira A. Complex I from the fungus Neurospora crassa. Biochim Biophys Acta 1998;1364:89-100.
16 - Duarte M, Schulte U, Ushakova A, Videira A. Neurospora Strains Harboring Mitochondrial Disease-Associated Mutations in Iron-Sulfur Subunits of Complex I. Genetics 2005; 171:91-9.
17 - Martin MA, Blazquez A, Gutierrez-Solana LG, et al. Leigh syndrome associated with mitochondrial complex Ideficiency due to a novel mutation in the NDUFS1 gene. Arch Neurol 2005;62:659-61.
18 - Bénit P, Chretien D, Kadhom N, et al.Large-Scale deletion and point mutations of the nuclear NDUFV1 and NDUFS1 genes in mitochondrial complex I deficiency. Am J Hum Genet 2001;68:1344-52.
19 - Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, et al. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. Biochim Biophys Acta 2004;1659:136-47.
20 - Loeffen J, Elpeleq O, Smeitink J, et al. Mutations in the complex I NDUFS2 gene of patients with cardiomyopathy and encephalomyopathy. Ann Neurol 2001;49:195-201.
21 - Benit P, Slama A, Cartault F, et al. Mutant NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome. J Med Genet 2004;41:14-7.
22 - Benit P, Steffann J, Lebon S, et al. Genotyping microsatellite DNA markers at putative disease loci in inbred/multiplex families with respiratory chain complex I deficiency allows rapid identification of a novel nonsense mutation (IVS1nt -1) in the NDUFS4 gene in Leigh syndrome. Hum Genet 2003b;112:563-6.
23 - Petruzzella V, Vergari R, Puzziferri I, et al. A nonsense mutation in the NDUFS4 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. Hum Mol Genet 2001;10:529-35.
24 - Budde SM, van den Heuvel LP, Janssen AJ, et al. Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. Biochem Biophys Res Commun 2000;275:63-8.
25 - van den Heuvel, Ruitenbeek W, Smeets R, et al. Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit. Am J Hum Genet 1998;62:262-8.
26 - Kirby DM, Salemi R, Sugiana C, et al. NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. J Clin Invest 2004;114:837-45.
27 - Triepels RH, van den heuvel LP, Loeffen JL, et al. Leigh syndrome associated with a mutation in the NDUFS7 (PSST) nuclear encoded subunit of complex I. Ann Neurol 1999;45:787-90.
28 - Lebon S, Rodriguez D, Bridoux D, et al. A novel mutation in the human complex I NDUFS7 subunit associated with Leigh syndrome. Mol Genet Metab 2007a;90:379-82.
29 - Lebon S, Minai L, Chretien D, et al. A novel mutation of the NDUFS7 gene leads to activation of a cryptic exon and impaired assembly of mitochondrial complex I in a patient with Leigh syndrome. Mol Genet Metab 2007b; 92:104-8.
30 - Hinttala R, Uusimaa J, Remes AM, Rantala H, Hassinen IE, Majamaa K. Sequence analysis of nuclear genes encoding functionally important complex I subunits in children with encephalomyopathy. J Mol Med 2005;83:786-94.
31 - Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, et al. The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. Am J Hum Genet 1998;63:1598-608.
32 - Procaccio V, Wallace DC. Late-onset Leigh syndrome in a patient with mitochondrial complex I NDUFS8 mutations. Neurology 2004;62:1899-1901.
33 - Schuelke M, Smeitink J, Mariman E, et al. Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. Nat Genet 1999;21:260-1.
34 - Schuelke M, Detjen A, van den heuvel L, et al. New nuclear encoded mitochondrial mutation illustrates pitfalls in prenatal diagnosis by biochemical methods. Clin Chem 2002;48:772-5.
35 - Benit P, Beugnot R, Chretien D, et al. Mutant NDUFV2 subunit ofmitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. Hum Mutat 2003a;21:582-6.
36 - Fernandez-Moreira D, Ugalde C, Smeets R, et al. X-Linked NDUFA1 Gene Mutations Associated with Mitochondrial Encephalomyopathy. Ann Neurol 2007;61:73-83.
37 - Ogilvie I, Kennaway N, Shoubridge E. A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. J Clin Invest 2005;115: 2784-92.
38 - Dunning CJR, McKenzie M, Sugiana C, et al. Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. EMBO 2007:1-11.

Correspondência:
Drª. Laura Vilarinho
Centro de Genética Médica Jacinto Magalhães
Praça Pedro Nunes, 88
4099-028 Porto

e-mail: laura.vilarinho@igm.min-saude.pt