

## Doenças mitocondriais: síndrome da depleção do mtDNA

### *Mitochondrial disorders: mitochondrial DNA depletion syndrome*

Célia Nogueira, Laura Vilarinho

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, INSA, Porto.

#### \_Resumo

As citopatias mitocondriais constituem um importante grupo de doenças metabólicas de expressão clínica heterogénea, para as quais não existe uma terapia eficaz. A maioria destas doenças é causada por uma disfunção ao nível da fosforilação oxidativa (OXPHOS), originando consequentemente uma deficiente produção de energia. O correto funcionamento da OXPHOS resulta de uma interação coordenada entre o genoma nuclear e mitocondrial. Assim, as doenças mitocondriais podem ser causadas por defeitos moleculares no genoma mitocondrial, no nuclear, ou em ambos, originando as doenças da comunicação intergenómica, que resultam na perda ou na instabilidade do DNA mitocondrial (mtDNA), e podem causar quer deleções múltiplas, quer depleção do genoma mitocondrial. A síndrome da depleção do mtDNA constitui um grupo de doenças raras, autossómicas recessivas, que se manifestam maioritariamente após o nascimento, causando a morte de muitos doentes durante a infância ou início da adolescência devido a uma redução acentuada do número de cópias do mtDNA. Trata-se de uma síndrome fenotipicamente heterogénea, apresentando-se sob três apresentações clínicas: hepatocerebral, miopática e encefalomiopática. A caracterização molecular destes doentes é importante não só para permitir a realização de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal adequados, mas também para melhorar a compreensão da fisiopatologia da doença e as opções terapêuticas.

#### \_Abstract

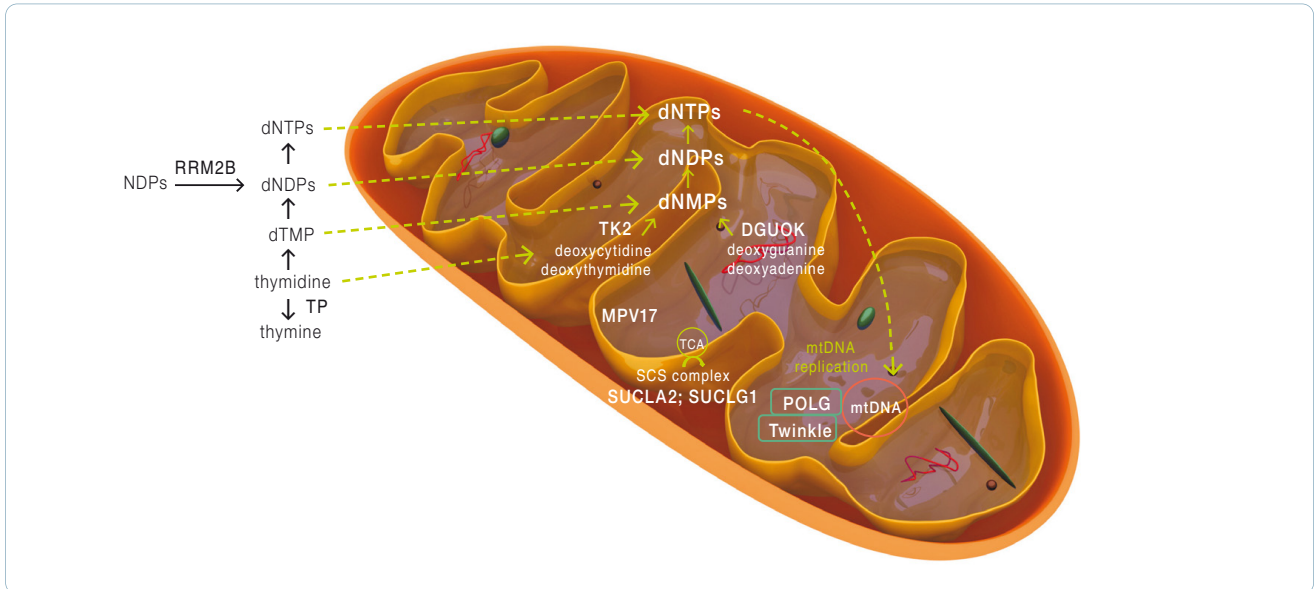
*Mitochondrial dysfunction accounts for an important and heterogeneous group of inherited metabolic disorders with hitherto no effective therapeutic options. Most of the known mitochondrial disorders are caused primarily by a dysfunctional oxidative phosphorylation and consequently a deficient energy production. This system depends on the coordinated expression of both nuclear and mitochondrial genomes. Thus, mitochondrial diseases can be caused by genetic defects in either the mitochondrial or the nuclear genome, or in the cross-talk between both. This impaired cross-talk gives rise to so-called nuclear-mitochondrial intergenomic communication disorders, which result in loss or instability of the mitochondrial genome and, in turn, impaired maintenance of qualitative and quantitative mtDNA integrity. The mitochondrial DNA depletion syndrome (MDS) is a clinically heterogeneous group of disorders with an autosomal recessive pattern of transmission that have onset in infancy or early childhood and are characterized by a reduced number of copies of mtDNA in affected tissues and organs. The MDS can be divided into three clinical presentations: hepatocerebral, myopathic and encephalomyopathic. Identifying the causative genes is important not only to allow adequate antenatal options, family planning and prenatal diagnosis, but also to improve understanding of the disease pathophysiology and, therefore, improve therapeutic options.*

#### \_Introdução

Nos últimos 30 anos, um largo espectro de doenças multissistémicas associadas a disfunções da mitocôndria, globalmente designadas de citopatias mitocondriais apresentam uma incidência de 1/5000 indivíduos e podem afetar qualquer órgão ou tecido do organismo (1,2). Estas doenças são uma causa comum de mortalidade e/ou morbilidade crónica, não estando disponível, salvo raras exceções, nenhuma terapia eficaz. As doenças mitocondriais podem ser causadas por defeitos moleculares no genoma mitocondrial, no nuclear, ou em ambos, originando doenças da comunicação intergenómica. Estas doenças resultam da perda ou instabilidade do DNA mitocondrial (mtDNA), e podem ser devidas quer a deleções múltiplas, quer a depleção do genoma mitocondrial, tendo sido descritos nos últimos anos um vasto número de genes associados a estas patologias (3).

A síndrome da depleção do mtDNA (MDS) caracteriza-se por uma redução acentuada do número de cópias do mtDNA em relação às do DNA nuclear (nDNA), associada muitas vezes a um défice múltiplo dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM). Este grupo de doenças raras e devastadoras manifesta-se após o nascimento, causando a morte prematura de muitos doentes durante a infância ou início da adolescência (4). Esta síndrome é transmitida de modo autossómico recessivo e pode apresentar-se sob três formas: hepatocerebral, miopática e encefalomiopática (5,6). O seu mecanismo fisiopatológico encontra-se resumido na figura 1 e está fundamentalmente relacionado com a manutenção dos níveis livres de nucleótidos mitocondriais, que assume um papel crucial na replicação e integridade do mtDNA. As enzimas envolvidas neste processo constituem a maior fonte de precursores de mtDNA nos tecidos de baixo poder de renovação, tais como fígado, cérebro e músculo.

Figura 1: Representação esquemática da mitocôndria e dos genes envolvidos na síndrome da depleção do DNA mitocondrial.



Na mitocôndria podem-se identificar genes envolvidos na replicação do mtDNA (*POLG* e *C10orf2* - Twinkle), genes que afetam o metabolismo da pool de nucleótidos mitocondrial (*DGUOK*, *TK2*, *MPV17* e *RRM2B*), e genes envolvidos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (*SUCLA2* e *SUCLG1*) e que consequentemente afetam a fosforilação oxidativa. Imagem de Nogueira *et al*, 2014 (4).

Assim, alterações nos genes *DGUOK*, *TK2*, *MPV17*, *RRM2B*, *POLG*, *C10orf2*, *SUCLA2* e *SUCLG1* podem causar uma redução acentuada do número de cópias do mtDNA nos tecidos afetados, confirmando o diagnóstico clínico desta síndrome (7).

### \_Objetivo

Efetuar breve descrição das principais apresentações clínicas desta síndrome, assim como das abordagens de diagnóstico e respetivas considerações terapêuticas.

### \_Síndrome da depleção do mtDNA: manifestações clínicas

*i) Forma hepatocerebral:* A forma hepatocerebral é a apresentação mais comum de MDS (6). O aparecimento ocorre na infância e os sintomas iniciais incluem vômitos persistentes, atraso de crescimento, hipotonia e hipoglicemia. As mitocôndrias hepáticas apresentam normalmente, uma deficiência combinada dos complexos da CRM codificados pelo mtDNA. A falência multiorgânica ocorre normalmente no primeiro ano de vida. Uma apresentação peculiar da forma hepatocerebral

é a síndrome de *Alpers-Huttenlocher*, de aparecimento precoce e fatal, caracterizado por falência hepática, convulsões, evoluindo para epilepsia parcial contínua e deterioração neurológica global. A disfunção hepática é normalmente progressiva e evolui de esteatose microvesicular com proliferação dos ductos biliares para cirrose e falência hepática crónica. O uso de valproato de sódio como terapia para a epilepsia pode precipitar a falência hepática aguda. Os genes *DGUOK* e *MPV17* são os que apresentam maior número de mutações descritas associadas à forma hepatocerebral. No entanto mutações nos genes *POLG*, *C10orf2*, *TK2* e *SUCLG1* podem também estar associadas a esta forma de apresentação clínica (6, 8-12).

*ii) Forma miopática:* Na forma miopática de MDS, o aparecimento de sintomas ocorre no primeiro ano de vida, com dificuldades alimentares, atraso de crescimento, hipotonia e fraqueza muscular. A creatina cínase está frequentemente aumentada, sendo um marcador importante para o diagnóstico, uma vez que não é muito comum em doentes com outras miopatias mitocondriais (13). Os doentes morrem maioritariamente nos primeiros anos de vida devido a insuficiência pul-

monar e infeções, mas existem casos que sobreviveram até à adolescência (14). Estas manifestações clínicas e bioquímicas são acompanhadas de sinais morfológicos típicos de miopatia mitocondrial tal como a presença de fibras citocromo c oxidase negativas. A proliferação de mitocôndrias sob a forma de fibras, *ragged red fibers*, não é uma característica primária consistente mas, no entanto, pode aparecer mais tarde no decurso da doença. Defeitos bioquímicos em todos os complexos da CRM codificados pelo mtDNA estão normalmente presentes nas mitocôndrias do tecido muscular.

Mutações nos genes *TK2*, *POLG*, *RRM2B* e *DGUOK* encontram-se associadas a esta forma, sendo o gene *TK2* o que apresenta maior número de mutações descritas (6,8,10,13).

iii) **Forma encefalomiopática:** Na forma encefalomiopática o aparecimento dos sintomas ocorre na infância, e manifestam-se através de hipotonia muscular, atraso psicomotor grave, deterioração neurológica progressiva, surdez, perda de movimentos voluntários, oftalmoplegia externa, convulsões generalizadas e variável disfunção tubular renal. Verifica-se um aumento do lactato sanguíneo e, na ressonância magnética cerebral, podem-se observar lesões nos gânglios basais sugestivas de síndrome de Leigh (3). Mutações nos genes *RRM2B*, *SUCLA2* e *SUCLG1* estão associadas a esta forma clínica (6,12,15).

### **\_Síndrome da depleção do mtDNA: abordagens de diagnóstico**

O estudo das doenças mitocondriais foi implementado em Portugal pelo nosso grupo no ano de 1993 e até à data foram investigados mais de 2500 doentes bioquímica, enzimática e/ou clinicamente suspeitos de Citopatia Mitocondrial. Cerca de 50 destes doentes apresentaram depleção do mtDNA, dos quais 50% revelaram mutações nos genes nucleares associados a MDS.

A análise por *southern-blot* ou por PCR quantitativo em tempo real são dois dos métodos que detetam simultaneamente a depleção do mtDNA. Independentemente da tecnologia aplicada utiliza-se um gene nuclear de referência específico para a análise (*RNA18S*) sendo muito importante o uso de controlos da mesma idade e do mesmo tecido, dada a natureza dinâmica da qualidade e quantidade do mtDNA (16).

Considera-se como valor limiar para o diagnóstico de depleção do mtDNA uma redução do número de cópias de mtDNA superior a 65% em relação aos indivíduos controlo, podendo esta redução atingir os 80-90%, nos casos mais graves.

Os dados bioquímicos, tais como défices combinados dos complexos enzimáticos da CRM, aumento do lactato e piruvato, quer no plasma, no líquido cefalorraquidiano ou na urina, alteração do perfil de ácidos orgânicos, aumento da alanina no perfil dos aminoácidos plasmáticos, assim como os dados de ressonância/tomografia cerebral são indicadores importantes para o diagnóstico destas patologias.

### **\_Síndrome da depleção do mtDNA: considerações terapêuticas**

As citopatias mitocondriais não têm de momento qualquer terapia eficaz disponível (17), à exceção dos défices primários de ubiquinona. (Q10) que são muito raros. O tratamento efetuado é meramente paliativo usando-se vitaminas, cofatores e substratos respiratórios que se revelaram pouco eficazes. No entanto, verifica-se que há uma estratégia diferente para cada caso. Por exemplo, o transplante hepático pode ser benéfico para doentes com hepatopatia causada por mutações nos genes *DGUOK*, *MPV17* e *POLG* desde que não tenham desenvolvido sintomas neurológicos (18).

### **\_Considerações finais**

A síndrome da depleção do mtDNA tem surgido cada vez mais como uma das principais causas de um amplo espectro de patologias multissistémicas de início maioritariamente após o nascimento. A caracterização molecular destes doentes é importante não só para permitir a realização de aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal adequados, nos casos em que forem identificados mutações no nDNA, mas também para melhorar a compreensão da fisiopatologia da doença.

Os avanços recentes na tecnologia de sequenciação de nova geração irão permitir esclarecer a etiologia molecular de doentes suspeitos de patologia mitocondrial, possibilitando a identificação de mutações causais em novos genes, por vezes não diretamente relacionados com patologias mitocondriais (19-21).

**Referências bibliográficas:**

- (1) Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet.* 2012;13(12):878-90. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959762/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959762/)
- (2) Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, et al. The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1659(2-3):115-20. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272804002713](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272804002713)
- (3) Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene.* 2005;354:162-8. Review.
- (4) Nogueira C, Almeida LS, Nesti C, et al. Syndromes associated with mitochondrial DNA depletion. *Ital J Pediatr.* 2014;40:34. <http://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1824-7288-40-34>
- (5) Suomalainen A, Isohanni P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord.* 2010;20(7):429-37.
- (6) El-Hattab AW, Scaglia F. Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics.* 2013;10(2):186-98. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3625391/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3625391/)
- (7) Nogueira C, Carozzo R, Vilarinho L, et al. Infantile-onset disorders of mitochondrial replication and protein synthesis. *J Child Neurol.* 2011;26(7):866-75.
- (8) Copeland WC. Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2012;47(1):64-74. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3244805/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3244805/)
- (9) Nogueira C, de Souza CF, Husny A, et al. MPV17: fatal hepatocerebral presentation in a Brazilian infant. *Mol Genet Metab.* 2012;107(4):764.
- (10) Horvath R, Hudson G, Ferrari G, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain.* 2006;129(Pt 7):1674-84. <http://brain.oxfordjournals.org/content/129/7/1674.long>
- (11) Hakonen AH, Isohanni P, Paetau A, et al. Recessive Twinkle mutations in early onset encephalopathy with mtDNA depletion. *Brain.* 2007;130(Pt 11):3032-40. <http://brain.oxfordjournals.org/content/130/11/3032.long>
- (12) Ostergaard E, Christensen E, Kristensen E, et al. Deficiency of the alpha subunit of succinate-coenzyme A ligase causes fatal infantile lactic acidosis with mitochondrial DNA depletion. *Am J Hum Genet.* 2007;81(2):383-7. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707612038](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707612038)
- (13) Spinazzola A, Zeviani M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene.* 2005;354:162-8. Review.
- (14) Oskoui M, Davidzon G, Pascual J, et al. Clinical spectrum of mitochondrial DNA depletion due to mutations in the thymidine kinase 2 gene. *Arch Neurol.* 2006;63(8):1122-6. <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=791965>
- (15) Nogueira C, Meschini MC, Nesti C, et al. A novel SUCLA2 mutation in a Portuguese child associated with "mild" methylmalonic aciduria. *J Child Neurol.* 2015;30(2):228-32. Epub 2014 Mar 20.
- (16) DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658(1-2):80-8.
- (17) Pfeffer G, Horvath R, Klopstock T, et al. New treatments for mitochondrial disease--no time to drop our standards. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(8):474-81.
- (18) Dimmock DP, Zhang Q, Dionisi-Vici C, et al. Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase. *Hum Mutat.* 2008;29(2):330-1.
- (19) Vasta V, Ng SB, Turner EH, et al. Next generation sequence analysis for mitochondrial disorders. *Genome Med.* 2009;1(10):100. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784303/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2784303/)
- (20) Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(118):118ra10. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3523805/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3523805/)
- (21) Haack TB, Haberberger B, Frisch EM, et al. Molecular diagnosis in mitochondrial complex I deficiency using exome sequencing. *J Med Genet.* 2012;49(4):277-83.