

Diagnóstico e investigação bioquímica e molecular das citopatias mitocondriais em Portugal: três décadas de história (1993-2024)

Biochemical and molecular diagnosis and research of mitochondrial cytopathies in Portugal: three decades of history (1993-2024)

Célia Nogueira^{1,2}, Cristina Pereira², Laura Vilarinho^{1,2}

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(2) Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

As citopatias mitocondriais (CM) são causadas por disfunções ao nível do sistema da fosforilação oxidativa originando, conseqüentemente, uma deficiência de produção de energia. No seu conjunto representam um grupo de doenças genéticas e fenotipicamente heterogêneas com uma incidência estimada de 1:5000 nados-vivos. Estas doenças raras podem surgir em qualquer idade, sendo mais frequentes em crianças, e podem ser causadas por defeitos genéticos no genoma mitocondrial, no genoma nuclear ou na interação entre os dois genomas. As vias metabólicas envolvidas na comunicação mito-nuclear são complexas e, segundo a literatura, o proteoma mitocondrial possui cerca de 1500 proteínas com um número de genes candidatos equivalentes.

O estudo destas patologias em Portugal foi implementado em 1993 pela Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética (URN), e, até à data, foram investigados mais de 4000 doentes. O objetivo deste trabalho foi esclarecer a etiologia molecular destes doentes suspeitos de CM. A investigação das CM tem sido um grande desafio, uma vez que é necessária uma abordagem multidisciplinar ao nível clínico, histológico, bioquímico e genético para se atingir um diagnóstico definitivo destes doentes.

Na última década, o desenvolvimento da tecnologia de sequenciação de nova geração revolucionou o diagnóstico molecular das doenças genéticas raras, de difícil diagnóstico, tais como as CM e proporcionou a caracterização molecular de mais de 30% dos doentes estudados. A atualização da abordagem molecular ao longo dos anos tem vindo a reforçar a URN como laboratório nacional de referência para o diagnóstico das CM.

_Abstract

Mitochondrial cytopathies (MC) most often refer to the dysfunction of the mitochondrial oxidative phosphorylation system leading to deficiency in the ATP production. They represent a group of genetically and phenotypically heterogeneous disorders with an estimated incidence of 1:5000 live births. These rare diseases can occur at any age, being more frequent in children, and can be caused by genetic defects in the mitochondrial genome, in the nuclear genome or in the interplay between the two genomes. The pathways involved in the nucleus-mitochondria communication are complex and over 1500 proteins are listed in the mitochondrial proteome with a corresponding number of candidate genes.

Since 1993 the Newborn Screening, Metabolism & Genetics Unit (URN) has been involved in the study of MC, and to date more than 4,000 patients have been investigated. The aim of this work was to clarify the molecular etiology of these patients, suspected of MC. The research

of these pathologies is a great challenge because a multidisciplinary approach at the clinical, histological, biochemical, and genetic levels is required to achieve a definitive diagnosis of these patients.

In the last decade, the development of next-generation sequencing technology has revolutionized the molecular diagnosis of rare, difficult-to-diagnose genetic diseases, such as MC, and has enabled the molecular characterization of over 30% of the studied patients. URN has been recognized as a reference laboratory for the study of these pathologies in Portugal.

_Introdução

As citopatias mitocondriais (CM) integram um grupo de doenças genéticas raras de expressão clínica e genética heterogênea que afetam, maioritariamente, órgãos e tecidos com alta dependência energética, podendo os sintomas clínicos surgir quer na infância quer na idade adulta (1).

A prevalência estimada destas patologias situa-se entre 1 em 4000 a 1 em 5000 indivíduos, tornando-as uma das doenças metabólicas hereditárias mais comuns (2,3). Apesar disso, continuam a ser uma causa relevante de morbilidade e mortalidade crónica, não existindo ainda terapias eficazes para a maioria dos casos.

As funções mitocondriais são reguladas pelo duplo envolvimento do genoma mitocondrial (mtDNA) e do genoma nuclear (nDNA), estando associadas, respetivamente, a hereditariedade materna e mendeliana (4).

Sob o ponto de vista médico, a suspeita de CM é muitas vezes efetuada com base em apresentações clínicas peculiares, no entanto o diagnóstico destas patologias é muitas vezes complexo e difícil, exigindo uma ampla avaliação clínica e laboratorial (5).

Aproximadamente 15-30% das mutações causais destas doenças encontram-se descritas no DNA mitocondrial (6,7), mas a maioria dos casos são causados por mutações no "mitoma", o grupo de mais de 1500 genes nucleares que codificam proteínas necessárias para a i) função e manutenção mitocondrial (replicação e expressão do mtDNA), ii) forma e dinâmica mitocondrial (fissão e fusão), iii) biossíntese da Coenzima Q10 e iv) rede complexa que controla a formação e atividade da cadeia respiratória mitocondrial (8,9). Em princípio, todos esses genes devem ser considerados candidatos potenciais para CM, embora, até ao momento, tenham sido descritas mutações causais em aproximadamente 400 destes genes.

A Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética (URN) foi pioneira na investigação das CM em Portugal e tem-se dedicado, nos últimos 30 anos, ao estudo bioquímico e molecular de mais de 4000 doentes clinicamente suspeitos destas patologias, com o objetivo de esclarecer a sua respetiva etiologia molecular.

O diagnóstico das CM teve início em 1993 na URN, no Porto (figura 1) e baseava-se essencialmente na determinação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) em biópsia muscular. Em 1995, os primeiros estudos moleculares realizados permitiram diagnosticar alguns destes doentes. No entanto, a maioria continuou sem a identificação da mutação causal.

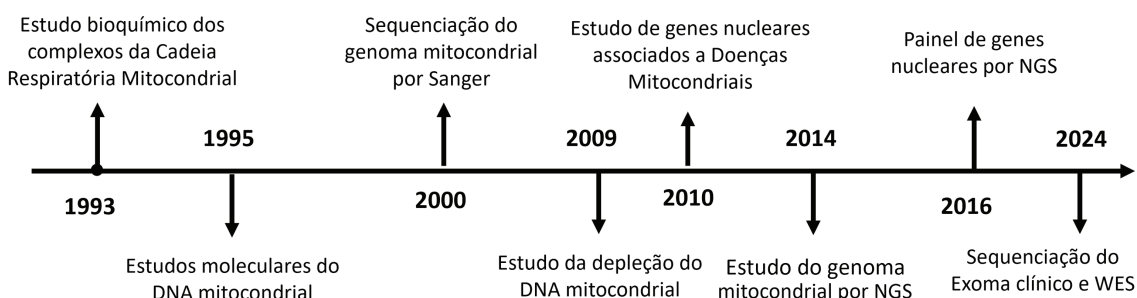
O diagnóstico definitivo das CM é efetuado com recurso a estudos moleculares, sendo um grande desafio por se tratar de um grupo heterogéneo de patologias com um curso de doença rapidamente progressivo e devastador na infância ou na primeira infância, onde as opções terapêuticas são escassas.

A sequenciação de nova geração (NGS) revolucionou o diagnóstico molecular destas doenças, uma vez que tem capacidade de gerar uma enorme quantidade de dados num curto espaço de tempo a um custo acessível, tornando esta abordagem ideal para uma vasta gama de aplicações, tais como: a sequenciação de um conjunto de genes previamente selecionados (painéis de NGS) ou a sequenciação do exoma humano completo (WES) ou do genoma humano completo (WGS) (10,11).

A introdução da tecnologia de NGS na URN possibilitou a sequenciação do mtDNA completo, assim como a implementação de um painel personalizado de genes nucleares associados a CM que, após a validação, foi utilizado num grupo de doentes com etiologia molecular desconhecida. Nos últimos anos iniciamos também a sequenciação do exoma clínico e WES em alguns doentes que continuavam sem diagnóstico molecular.

A abordagem multidisciplinar bem como a adoção das novas tecnologias tem-nos permitido efetuar o diagnóstico das CM de forma cada vez mais eficaz ao longo dos anos tornando a URN uma referência a nível nacional.

Figura 1: Cronograma da implementação do diagnóstico das citopatias mitocondriais no INSA (1993-2024).



NGS – Next Generation Sequencing; WES – Whole Exome Sequencing

_Objetivo

Este trabalho apresenta os resultados, de 1993 a 2004, da investigação de cerca de 4000 doentes suspeitos de doenças mitocondriais selecionados por clínicos especializados nas áreas de Neurologia, Pediatria, Neuropediatria, entre outras, com o objetivo de esclarecer a sua respetiva etiologia molecular.

Doentes e métodos

Ao longo destes 30 anos foram estudados mais de 4000 doentes com suspeita clínica e histológica de CM, em que cerca de 2500 realizaram biópsias musculares e os restantes realizaram colheita de sangue em EDTA.

O estudo bioquímico envolveu a determinação das atividades enzimáticas dos complexos I-IV e do complexo II+III da CRM, em homogeneizados de biópsia muscular, por espectrofotometria.

As mutações mais frequentes do mtDNA foram inicialmente pesquisadas pelas metodologias tradicionais de PCR/RFLP e sequenciação de Sanger. As grandes deleções do mtDNA foram investigadas por Southern-Blot e, posteriormente, por Long-Range PCR e NGS. Estes rearranjos foram pesquisados em DNA extraído a partir de biópsia muscular, à exceção dos casos com suspeita de Síndrome de Pearson e em alguns casos de síndrome de Kearns-Sayre, caracterizados por um número elevado de deleções no sangue. Inicialmente os estudos genéticos de genes nucleares associados a CM foram efetuados pelos procedimentos *standard* de Sequenciação de Sanger.

O NGS foi implementado na URN em 2014 para a sequenciação do mtDNA completo e um painel de genes nucleares associado a CM, tendo sido efetuado no sequenciador *MiSeq* (Illumina). Para capturar os genes nucleares, foi utilizado um painel personalizado com 213 genes associados a CM, de acordo com a metodologia SureSelect XT HS (Agilent Technologies). Para o mtDNA completo, utilizou-se a metodologia *Nextera XT* (Illumina). Para a análise procedeu-se como descrito anteriormente (12).

_Resultados

Desde 1993 este estudo envolveu cerca de 4000 doentes provenientes de sete hospitais nacionais, localizados no norte, centro e sul de Portugal. A idade de início da doença foi muito variável, dos 4 dias aos 78 anos de vida. Os sintomas neurológicos foram os mais frequentes, seguidos dos musculares, oftalmológicos, cardíacos e auditivos. O grupo pediátrico foi o mais representado apesar deste estudo inicialmente ter envolvido um grupo de adultos previamente selecionados com base em alterações histológicas na biópsia muscular.

Nos ~2500 doentes que realizaram biópsia muscular foram identificados 511 com alterações histológicas características ou com défices isolados ou combinados da CRM, 87 doentes com deleções simples do mtDNA, 111 com deleções múltiplas do mtDNA, 25 com depleção do mtDNA e 62 com mutações descritas no mtDNA.

Mais recentemente, dos ~1500 doentes estudados por NGS e/ou sequenciação de Sanger a partir do DNA de células sanguíneas, 66 apresentaram as mutações descritas no mtDNA e 117 mutações em genes nucleares associados às CM.

Este estudo permitiu identificar em biópsia muscular uma causa molecular em 10,4% dos doentes estudados (169/2500), todos com variantes no genoma mitocondrial, sendo a maioria adultos com grandes deleções. Nos 1500 doentes em que o estudo foi efetuado numa amostra de sangue a percentagem de casos positivos foi de 12,2%. De realçar que a maioria destes diagnósticos moleculares resultaram da abordagem por NGS em 450/1500 doentes, criteriosamente selecionados, e eram crianças em que se identificaram essencialmente mutações nos genes nucleares. Se considerarmos apenas os 450 doentes, como grupo de estudo, a percentagem de casos positivos é de 30% conforme publicado no estudo anterior (13). Neste grupo de 450 doentes identificamos 72 variantes patogénicas descritas na literatura, 20 novas variantes provavelmente patogénicas e 62 variantes de significado indeterminado (VUS), segundo os critérios do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (14), algumas já previamente descritas pela Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (URN-INSA) (12,13,15).

Discussão

O diagnóstico das CM evoluiu de métodos tradicionais como o PCR/RFLP e Sanger, para a NGS, o que permite analisar rapidamente quer o mtDNA completo e quer o painel de genes nucleares associados a CM. Atualmente o sangue é considerado a amostra de primeira linha em vez da biópsia muscular, sendo esta utilizada apenas para confirmar grandes deleções/depleção do mtDNA, avaliar a patogenicidade de VUS e determinar a percentagem de heteroplasmia.

Na URN a adoção da NGS permitiu efetuar um número crescente de diagnósticos tendo possibilitado, no caso do mtDNA, alargar o estudo para além das mutações pontuais mais comuns, e, relativamente aos genes nucleares foi fundamental uma vez que se passou da investigação de “gene a gene” para centenas de genes nucleares simultaneamente.

Os resultados apresentados permitiram demonstrar que na população adulta as grandes deleções no mtDNA constituem a alteração molecular mais comum e que para a identificação destes rearranjos é necessário dispor de uma biópsia muscular. Na população pediátrica as mutações no nDNA são as mais frequentes e uma abordagem por NGS numa amostra de sangue, através de um painel de genes associados a CM, permite uma investigação mais célere e com uma taxa de positividade 15-25% superior. A sequenciação da molécula de mtDNA completa por NGS é igualmente uma vantagem uma vez que tem permitido alargar o espectro de mutações neste genoma bem como a diversidade de fenótipos a que estão associadas.

Conclusões

Os resultados de três décadas de estudo e investigação das doenças mitocondriais (1993-2024), na URN do INSA-Porto, demonstram o contributo da tecnologia de NGS para esclarecer a etiologia molecular de doentes suspeitos destas patologias, alargar o espectro mutacional e oferecer em alguns casos um diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético aos casais em risco.

Apesar deste avanço tecnológico, muitos doentes permaneceram sem caracterização molecular, pelo que a aplicação de WES ou WGS será, no futuro, fundamental para permitir uma maior eficácia no diagnóstico das CM.

Financiamento:

Fundação da Ciência e Tecnologia (PTDC/DTP-PIC/2220/2014, Genetic Defects of Mitochondrial Diseases: a Next Generation Sequencing Approach); Ao Programa Norte 2020 (NORTE-01-0246--FEDER-000014, DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”).

Agradecimentos:

À Lisbeth Silva, Mateus Laranjeira, Altina Lopes e Raquel Neiva pelo apoio técnico na preparação e análise de dados de NGS e Sequenciação de Sanger. À UTI do DGH_INSA pela colaboração na confirmação das variantes identificadas, pelo método de Sanger. À Marisa Encarnação pelo apoio técnico no sequenciador MiSeq.

Referências bibliográficas:

- (1) Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, et al. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol.* 2017 Jan;241(2):236-50. Epub 2016 Nov 2. <https://doi.org/10.1002/path.4809>
- (2) Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2016 Oct 20;2:16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- (3) Grigalionienė K, Burnytė B, Ambrozaitytė L, et al. Wide diagnostic and genotypic spectrum in patients with suspected mitochondrial disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2023 Oct 2;18(1):307. doi: <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02921-0>
- (4) Martins MC, Olim G, Melo J, et al. Hereditary anaemias in Portugal: epidemiology, public health significance, and control. *J Med Genet.* 1993 Mar;30(3):235-9. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.3.235>
- (5) Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis ; Haas RH, Parikh S, Falk MJ, et al. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab.* 2008 May;94(1):16-37. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.018>
- (6) Ohtake A, Murayama K, Mori M, et al. Diagnosis and molecular basis of mitochondrial respiratory chain disorders: exome sequencing for disease gene identification. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Apr;1840(4):1355-9. Epub 2014 Jan 24. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.01.025>
- (7) Tucker EJ, Compton AG, Thorburn DR. Recent advances in the genetics of mitochondrial encephalopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010 Jul;10(4):277-85. <https://doi.org/10.1007/s11910-010-0112-8>
- (8) Herrmann JM, Longen S, Weckbecker D, et al. Biogenesis of mitochondrial proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2012;748:41-64. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_3
- (9) Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D1251-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1003>

artigos breves_ n. 9

- (10) Carroll CJ, Brilhante V, Suomalainen A. Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *Br J Pharmacol.* 2014 Apr;171(8):1837-53. <https://doi.org/10.1111/bph.12469>
- (11) Wong L.J. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion.* 2013 Jul;13(4):379-87. Epub 2013 Mar 6. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.02.001>
- (12) Nogueira C, Pereira C, Silva Lisbeth, et al. Avanços no diagnóstico das doenças mitocondriais através da sequenciação de nova geração. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2018;7(21):5-8. <http://hdl.handle.net/10400.18/5546>
- (13) Nogueira C, Silva L, Pereira C, et al. Targeted next generation sequencing identifies novel pathogenic variants and provides molecular diagnoses in a cohort of pediatric and adult patients with unexplained mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion.* 2019 Jul;47:309-17. <http://hdl.handle.net/10400.18/6560>
- (14) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. ; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. Epub 2015 Mar 5. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- (15) Nogueira C, Pereira C, Silva L, et al. Doenças mitocondriais na era da sequenciação de nova geração: estudo de 450 doentes. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2024;35:52-9. <http://hdl.handle.net/10400.18/9184>