

BALBINA MARIA MORAIS TEIXEIRA

DEPLEÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL (mtDNA) EM LEUCÓCITOS
DE DOENTES COM DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH:
UM ESTUDO PILOTO



Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2015

BALBINA MARIA MORAIS TEIXEIRA

DEPLEÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL (mtDNA) EM LEUCÓCITOS
DE DOENTES COM DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH:
UM ESTUDO PILOTO

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas,
apresentada à Universidade dos Açores

Orientadora: Professora Doutora Maria Manuela de Medeiros Lima



Universidade dos Açores
Departamento de Biologia
Ponta Delgada
2015

*“If you can't fly then run, if you can't run then walk,
if you can't walk then crawl,
but whatever you do you have to keep moving forward.”*

Martin Luther King Jr.

AGRADECIMENTOS

É com gratidão que deixo aqui um verdadeiro reconhecimento a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho. No entanto, gostaria de expressar um sincero agradecimento:

À Professora Doutora Manuela Lima por me ter proporcionado a realização desta dissertação e acolhido no seu grupo de trabalho. Agradeço a oportunidade e todos os conhecimentos e sabedoria que me transmitiu como orientadora e professora. Deixo-lhe o mais sincero agradecimento.

À Dra. Mafalda Raposo pela disponibilidade, pela orientação em diferentes fases desta dissertação e, sobretudo, por toda a ajuda e paciência durante a realização da mesma.

À São Araújo por toda a ajuda, conversas e momentos que tiveste que me aturar à porta do teu gabinete à procura de algo ou alguém, deixo-te um sincero obrigado.

Aos meus colegas de Mestrado, por partilharem comigo um ano em que todos acreditamos e mantivemos a esperança, de uma forma ou de outra conseguimos.

À minha mãe Rosalina e irmãos Noélia, Luísa e Lúcia aquele obrigado especial pelo apoio incondicional e incentivo constantes ao longo desta fase: vocês são os meus alicerces.

E, por fim, um agradecimento especial à Catarina e ao Rodrigo, por todo o apoio, amizade e ajuda nesta viagem atribulada e, sobretudo, por me lembrarem sempre para não desistir.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1.1. Epidemiologia e caracterização clínica da doença	2
1.1.2. Genética molecular e patogénese	4
1.1.3. Alterações mitocondriais na doença de Machado-Joseph.....	5
1.1.4. As alterações mitocondriais como potenciais biomarcadores da doença de Machado-Joseph	8
CAPÍTULO 2: SUJEITOS E MÉTODOS	11
2.1. Sujeitos.....	12
2.2. Métodos laboratoriais	12
2.2.1. PCR quantitativo em tempo real	12
2.3. Análise Estatística	15
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	16
3.1. Caracterização demográfica da amostra.....	17
3.2. Caracterização clínica e genética dos doentes	19
3.3. Análise do número de cópias de mtDNA em amostras de doentes de Machado-Joseph	21
3.3. Influência do número de cópias de mtDNA na Idade de início, número de repetições do alelo expandido e duração da doença de Doentes Machado-Joseph	23
CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	25
CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência da DMJ em diferentes populações mundiais, em relação às outras SCAS (adaptado de Bettencourt & Lima, 2011).	3
Tabela 2 - <i>Primers</i> e condições utilizadas no qPCR para a determinação do número de cópias de mtDNA.	13
Tabela 3 - Diluições seriadas para a obtenção de soluções padrão para a elaboração da curva de eficiência.....	14
Tabela 4 – Valores obtidos para o número de cópias mtDNA em sangue de casos e controlos em estudos de diferentes doenças.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - Distribuição dos doentes quanto ao género e à naturalidade (N=25).....	17
Fig. 2 - Distribuição dos controlos quanto ao género e à naturalidade (N=50).....	18
Fig. 3 - Distribuição de idades dos indivíduos em estudo (N=75).....	18
Fig. 4 - Distribuição das idades de início nos doentes (N=25).....	19
Fig. 5 - Distribuição da duração da doença nos doentes (N=25).....	19
Fig. 6 - Frequências alélicas no locus <i>ATXN3</i> dos doentes estudados (N=50 cromossomas).....	20
Fig. 8 - Associação entre o número de repetições CAG no alelo expandido e da idade de início dos sintomas na série de doentes em estudo.	21

RESUMO

Introdução: A doença de Machado-Joseph (DMJ), também denominada por ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3; OMIM 109150; ORPHA 98757) é uma doença neurodegenerativa autossômica dominante de início tardio, caracterizada por uma expressão clínica variável. A mutação causal da DMJ corresponde a uma expansão instável da repetição CAG no exão 10 do gene *ATXN3*, localizado em 14q32.1. Esta expansão, traduzida num trato poliglutamínico expandido, concede à proteína ataxina-3 uma função tóxica. Estudos recentes sugerem que danos mitocondriais e variações no DNA mitocondrial (mtDNA) desempenham um papel importante nas doenças poliglutamina (poliQ), tais como a doença de Huntington, a ataxia espinocerebelosa do tipo 2, a SCA3 e a atrofia muscular espinobulbar. A ocorrência destes danos, através da acumulação de alterações qualitativas e quantitativas, correlaciona-se com o declínio da função mitocondrial; dada a importância desempenhada pelas mitocôndrias em determinadas vias metabólicas, nomeadamente, apoptóticas, estas contribuem para o processo de envelhecimento, constituindo deste modo um fator de interesse nas doenças poliQ. As evidências atuais sugerem uma maior suscetibilidade aos efeitos do stress oxidativo e uma incapacidade de proteção contra os radicais livres. Para a DMJ a literatura científica disponível para alterações mitocondriais é reduzida e com resultados controversos, contudo alguns estudos parecem sugerir que, tal como em outras doenças poliQ, alterações nos mecanismos de proteção contra o stress oxidativo poderão desempenhar um papel na patogenidade desta doença. Sendo que a alteração no número de cópias do mtDNA foi reportada na DMJ, o objetivo principal do presente estudo consiste na avaliação do potencial das alterações no número de cópias de mtDNA como biomarcador de estado e de progressão da DMJ. **Sujeitos e Métodos:** O estudo segue um desenho de caso-controlo, tendo sido analisada uma amostra composta por 25 doentes de Machado-Joseph e 50 controlos emparelhados por idade e género. A abordagem laboratorial utilizada recorreu à técnica de PCR quantitativo em tempo real, com recurso à utilização de uma sonda fluorescente e *primers* específicos para o fragmento a amplificar. **Resultados:** O presente estudo permitiu confirmar que o número de cópias do mtDNA está alterado em amostras de sangue de doentes ($21,48 \pm 3,26$), verificando-se uma diminuição significativa comparativamente aos controlos ($35,13 \pm 2,31$). Não foi verificada nenhuma correlação significativa entre o número de cópias de mtDNA a as diferentes variáveis clínicas (idade de início e duração da doença) e genéticas (número de repetições CAG no alelo expandido) analisadas. **Discussão e Conclusões:** Os resultados obtidos neste estudo são sugestivos da importância do número de cópias do mtDNA como um promissor biomarcador de estado; no entanto não foi possível verificar o potencial deste como biomarcador de progressão. A determinação do número de cópias numa série maior de doentes e controlos vai permitir confirmar estes resultados.

ABSTRACT

Introduction: Machado-Joseph disease (MJD), also known as spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3), is an autosomal dominant late-onset neurodegenerative disorder characterized by clinical heterogeneity, namely in the appearance of first symptoms. MJD is caused by an expansion of a CAG repeat in the *ATXN3* gene, located at 14q32.1, which is translated into a polyglutamine (polyQ) tract, promoting a toxic gain of function to the ataxin-3 protein. Current studies suggest that mitochondrial DNA (mtDNA) alterations play an important role in several age-related neurodegenerative diseases, including polyQ diseases such as Huntington's disease, spinocerebellar ataxia type 2, SCA3 and spinobulbar muscular atrophy. The accumulation of qualitative and quantitative mtDNA alterations correlates with the mitochondrial function decline ; moreover, mitochondria plays an important role in several metabolic pathways, in particular, apoptosis, which could contribute to the aging process, thus constituting a factor of interest in polyQ diseases. Some evidences suggest that oxidative stress-associated mechanisms dysfunction may play a role in the pathogenesis of MJD. Moreover, alterations in the mtDNA copy number as well as the presence of deletions have been reported. The main goal of the present study is to investigate the potential of mtDNA copy number biomarker of MJD status as well as biomarker of progression. **Subjects and Methods:** mtDNA copy number was determined, by quantitative real-time PCR, in blood samples of 25 MJD patients and 50 age- and gender-matched controls. **Results:** MtDNA copy number was significantly decreased in blood cells of MJD patients (21.48 ± 3.26), compared to age and gender-matched controls (35.13 ± 2.31). No significant correlation was found between the mtDNA copy number and the clinical (age at onset and disease duration) and genetic (number of CAG repeats in expanded allele) variables. **Discussion and Conclusions:** mtDNA copy number is a potential candidate biomarker of MJD status; the potential as biomarker of progression was unconfirmed. Notwithstanding, further investigation using a larger number of patients and controls are needed to confirm these results.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE MACHADO-JOSEPH

1.1.1. Epidemiologia e caracterização clínica da doença

As ataxias espinocerebelosas (SCAs) são consideradas doenças raras a nível mundial, com uma prevalência estimada entre os 0,3 a 2,0 por 100 000 pessoas (van de Warrenburg *et al.* 2002). A ataxia espinocerebelosa do tipo 3 (SCA3), também denominada por doença de Machado-Joseph (DMJ; OMIM 109150; ORPHA 98757) é o subtipo mais frequente, representando cerca de 15% a 45% da totalidade das SCAs em diversas populações e etnias mundiais (Costa & Paulson, 2012). Em Portugal, a SCA3 é relativamente frequente em Portugal continental (1:100 000), os valores de maior prevalência desta doença verifica-se numa pequena área no vale do rio Tejo (1:1000) (revisto em Bettencourt & Lima, 2011) e no arquipélago dos Açores, na ilha das Flores, onde se verifica a maior prevalência a nível mundial (1:146) (Araújo, 2012).

A DMJ é uma doença neurodegenerativa autossómica dominante de início tardio, que pode envolver os sistemas cerebeloso, piramidal, extrapiramidal, motor e oculomotor. Esta doença apresenta, em média, uma idade de início dos sintomas por volta dos 40 anos, com uma sobrevida média estimada de 21 anos (Coutinho, 1992); extremos de idade entre os 4 (Carvalho *et al.*, 2008) e os 70 anos (Coutinho, 1992) estão, contudo, relatados. As principais manifestações clínicas da DMJ são a ataxia cerebelosa, que se reflete na incoordenação dos movimentos que afetam a marcha, o equilíbrio e a fala (manifestação clínica mais frequente); e a oftalmoparésia externa progressiva (OEP) que se caracteriza por uma limitação dos movimentos oculares. A estas manifestações podem estar associados sinais piramidais, extrapiramidais e periféricos, em graus variáveis (Coutinho, 1992).

A acentuada heterogeneidade clínica e progressão natural desta doença representou uma barreira à definição clínica da mesma. Em termos históricos, a DMJ apresentou variadas designações, sendo inicialmente descrita em indivíduos descendentes de 3 famílias distintas, de origem açoriana (Machado, Thomas e Joseph) residentes nos Estados Unidos da América, levando a que, inicialmente fosse encarada como 3 entidades clínicas distintas: "doença do Machado" (Nakano *et al.*, 1972 *fide* Coutinho, 1992); "degenerescência nigro-espino-dentada com oftalmoplegia nuclear" (Woods & Schaumburg, 1972 *fide* Coutinho, 1992); e "forma autossómica dominante da degenerescência estriato-nígrica (Rosenberg *et al.*, 1992 *fide* Coutinho, 1992). A unificação desta como uma entidade clínica singular surgiu somente em 1978

por Coutinho e Andrade, após a identificação de variações clínicas numa mesma família, passando a adquirir a designação única de “Doença de Machado-Joseph”, em 1981, proposta por Coutinho e Sequeiros (Coutinho, 1992).

Tabela 1 – Frequência da DMJ, no grupo das SCAs, em diferentes populações mundiais (adaptado de Bettencourt & Lima, 2011).

País	Frequência
Brasil	69-92%
Portugal	58-74%
Singapura	53%
China	48-49%
Holanda	44%
Alemanha	42%
Japão	28-63%
Canadá	24%
Estados Unidos da América	21%
México	12%
Austrália	12%
Índia	5-14%
Africa do Sul	4%
Itália	1%

Dada a elevada heterogeneidade clínica e natureza progressiva que caracterizam esta doença foram, então, propostos por Coutinho & Andrade em 1978 (*fide* Coutinho, 1992), três tipos clínicos principais. O tipo 1 (Tipo “Joseph”) que apresenta um início mais precoce, com uma média de idade de início aos 24 anos, caracterizado por uma evolução mais severa no qual se encontram presentes os seguintes sinais clínicos: ataxia cerebelosa, OEP e sinais piramidais e extrapiramidais marcados. O tipo 2 (Tipo “Thomas”) apresenta uma idade início intermédia (média 40,5 anos) com um quadro clínico limitado à presença de ataxia cerebelosa e OEP, com ou sem presença de sinais piramidais; os sinais extrapiramidais e periféricos, quando presentes, são ligeiros. O tipo 3 (Tipo “Machado”) tem um início mais tardio (média 47 anos), com uma

progressão mais lenta, sendo caracterizado pela presença de ataxia cerebelosa, OEP, sinais piramidais e extrapiramidais ligeiros ou ausentes, com sinais periféricos muito evidente. Alguns autores sugerem, ainda, a existência de dois tipos clínicos adicionais: o tipo 4 caracterizado por parkinsonismo associado a sinais cerebelosos; e o tipo 5, caracterizado por paraparesia espástica sem ataxia cerebelosa (revisto em Costa & Paulson, 2012).

1.1.2. Genética molecular e patogénese

A mutação causal da DMJ corresponde a uma expansão instável da repetição CAG no gene *ATXN3* (MIM 607047), localizado em 14q32.1 (Kawaguchi *et al.*, 1994). O gene *ATXN3* abrange uma região genómica de cerca de 48 Kb e apresenta 13 exões. As repetições CAG estão localizadas na extremidade 5' do exão 10 (revisto em Bettencourt & Lima, 2011). A forma alélica normal deste gene apresenta consensualmente entre 12 a 44 repetições CAG, enquanto o alelo mutado apresenta mais de 54 repetições.

A DMJ é uma doença de transmissão autossómica dominante, tal como já referido. Os raros casos de homozigotia descritos referem uma forma mais severa da doença, o que sugere a presença de um efeito de dosagem génica. O gene da DMJ apresenta uma penetrância praticamente completa, estimada em cerca de 98%, apresentando um padrão dependente da idade (Bettencourt *et al.*, 2008). O tamanho da repetição CAG encontra-se inversamente correlacionado com a idade de início da doença; todavia, a explicação da variação da idade de início dada pelo número de repetições CAG é incompleta (50 - 75%), dependendo da série de doentes em estudo. A ausência de uma correlação completa entre a idade de início e a extensão do trato CAG na DMJ sugere o envolvimento de outros fatores, que podem ser de natureza ambiental ou genética (Lima *et al.*, 2012).

O gene *ATXN3* codifica uma proteína denominada de ataxina-3, que apresenta na sua forma nativa um peso molecular de aproximadamente, 40-43 kDa; estruturalmente é composta por 339 aminoácidos e por um número variável de poliglutaminas (poliQs). Esta proteína é expressa ubiquamente em tecidos neuronais e não neuronais, encontrando-se presente no núcleo e no citoplasma de diferentes tipos de células (revisto em Costa & Paulson 2012).

A ataxina-3 é uma proteína da família das cisteínas-proteases, sendo composta por um domínio globular Josefina com atividade catalítica, na região N-terminal, seguido de uma região

C-terminal não estruturada e flexível, que é composta por dois ou três motivos de interação com a ubiquitina e pelo trato poliQ (revisto em Costa & Paulson, 2012). O domínio Josefina, em conjunto com os motivos ubiquitina estão implicados no resgate de proteínas da degradação ou na estimulação da degradação, através da remoção de cadeias poli-ubiquitina inibitórias e pela regeneração de ubiquitinas livres e reutilizáveis. A via proteossoma-ubiquitina esta envolvida em variados processos celulares, tais como a degradação de proteínas, endocitose, regulação da transcrição e apresentação de antigénios (Evers *et al.*, 2013). Actualmente, o papel fisiológico da ataxina-3 continua, a ser estudado; contudo é consensual que na sua forma nativa a ataxina-3 é uma enzima desubiquitinante, desempenhando um papel nas vias de controlo celular da qualidade das proteínas (revisto em Bettencourt & Lima, 2011). É sugerido ainda o envolvimento desta proteína na regulação do processo de transcrição e na degradação de proteínas *misfolded* (Evers *et al.*, 2013).

A ataxina-3 mutada, quando o tracto poliQ atinge um limiar patológico, adquire um ganho de função neurotóxica, levando à morte neuronal, por processos ainda por esclarecer (revisto em Bettencourt & Lima, 2011). É proposto que este ganho de função se deva à perda da conformação nativa da proteína, através da perda de função normal, alteração da localização subcelular e, possivelmente, alteração na clivagem proteolítica. Estas consequências, poderão levar à alteração das suas propriedades e capacidade de interação com os seus parceiros nativos e à formação de oligómeros tóxicos e agregados insolúveis no núcleo, citosol e axónios dos neurónios. A desregulação da transcrição, o comprometimento da autofagia, a disfunção mitocondrial, a diminuição proteossomal e a diminuição do transporte axonal são outros processos associados à presença da ataxina-3 mutada. (Evers *et al.*, 2013).

1.1.3. Alterações mitocondriais na doença de Machado-Joseph

As evidências atuais sugerem que a ocorrência de alterações mitocondriais, designadamente a ocorrência de danos quantitativos e qualitativos ao nível do DNA mitocondrial (mtDNA) e o stress oxidativo poderão constituir um fatores de relevância nas doenças neurodegenerativas (Lin & Beal, 2006).

As mitocôndrias são organelos intracelulares presentes em todas as células eucarióticas que contêm genoma extracromossomal separado e distinto do genoma nuclear, desempenhando um papel central na respiração aeróbia e no fornecimento de substratos energéticos para as vias

metabólicas intracelulares, tais como a fosforilação oxidativa e ciclo de Krebs; apresentam, para além disso, uma função fundamental na sinalização celular, em particular na regulação da morte celular por apoptose (Schapira, 2006; Zapico & Ubelaker, 2013).

O DNA mitocondrial humano (mtDNA) é uma molécula circular de 16569 pares de bases que codifica 37 produtos génicos, nomeadamente, 13 polipéptidos intervenientes na cadeia respiratória, 2 RNAs ribossomais e 22 RNAs de transferência necessários para suportar a síntese proteica intramitocondrial (Lin & Beal, 2006). O número de moléculas de mtDNA varia entre diferentes tipos de tecidos e relaciona-se com a dependência de energia exibida por estes; assim, a maior densidade mitocondrial é observada em tecidos metabolicamente mais ativos, tais como os neurónios, bem como em tecidos musculares cardíacos e esqueléticos. A manutenção do número apropriado de cópias é essencial na sobrevivência neuronal e, conseqüentemente, a ocorrência de fenómenos de depleção mtDNA representa um fator de relevo na progressão de doenças neurodegenerativas (Baron *et al.*, 2007). A necessidade energética deste tipo de tecidos explica, de certo modo, a sensibilidades que estes exibem na ocorrência de deficiências ao nível mitocondrial (Schapira, 2006). Nomeadamente, na presença de mutações de natureza germinativa, o DNA mitocondrial caracteriza-se por causar uma variedade de doenças que, na sua maioria, se caracterizam por danos cerebrais e musculares (Lin & Beal, 2006).

O declínio da função mitocondrial encontra-se correlacionado com a acumulação de deleções e a produção de espécies reativas de oxigénio, o que dada a importância apresentada pelas mitocôndrias em determinadas vias metabólicas, nomeadamente, apoptóticas, sugere o envolvimento destes organelos no processo de envelhecimento (Kazachkova *et al.*, 2013a) e de neurodegeneração (Lin & Beal, 2006). A acumulação de níveis elevados de espécies reativas de oxigénio, superiores à capacidade antioxidante da célula, causa um estado de stress oxidativo ao nível celular, que resulta da incapacidade das mitocôndrias, em estado disfuncional, de remover eficazmente os radicais livres de oxigénio. Conseqüentemente, o stress oxidativo poderá modular funções celulares cruciais, podendo resultar na ativação da apoptose ou excitotoxicidade – duas causas da morte celular (Lin & Beal, 2006; Baron *et al.*, 2007).

Como anteriormente referido, a ocorrência de alterações ao nível do mtDNA tem sido associada a diversas doenças neurodegenerativas de poliQ, tais como a doença de Huntington (DH), a SCA2 e atrofia muscular espino-bulbar (SBMA) (Liu *et al.* 2008, Su *et al.* 2010). As evidências atuais sugerem uma maior suscetibilidade aos efeitos do stress oxidativo e um

incapacidade de proteção contra os radicais livres com o a idade, neste tipo de doenças (Lin & Beal, 2006).

Na DH existem fortes indicadores de que as alterações mitocondriais poderão desempenhar um papel na patogenicidade desta doença. Jenkins e colaboradores reportaram um aumento no lactato em regiões afetadas de doentes de DH, que de acordo com os autores sugere a presença de defeitos bioenergéticos (Jenkins *et al.*, 2005). Em outro estudo, a análise bioquímica em amostras de tecidos cerebrais de doentes DH revelou uma clara diminuição na atividade dos complexos II, III e V da cadeia transportadora de eletrões. Adicionalmente foram descritas alterações ultra-estruturais nas mitocôndrias em DH e a presença de deleções no mtDNA durante a progressão desta doença. Apesar das claras evidências de que o comprometimento grave da atividade mitocondrial poderá ser um importante evento na patogenicidade da HD, a base molecular subjacente permanece desconhecida (revisto em Lin & Beal, 2006; Bossy-Wetzel *et al.*, 2008)

Para a DMJ a literatura científica disponível para alterações mitocondriais é reduzida e com resultados controversos, contudo as evidências atuais parecem sugerir que, tal como em outras doenças poliQ, a presença de defeitos ao nível dos mecanismos de proteção contra o stress oxidativo poderão desempenhar um papel na patogenicidade desta doença (Evers *et al.*, 2013).

Um estudo realizado por Liu e colaboradores demonstrou uma depleção significativa no número de cópias de mtDNA em doentes poliQ, entre as quais a DMJ, em relação em indivíduos saudáveis. De acordo com os resultados obtidos, os autores propuseram que o stress oxidativo podia estar na base da diminuição do conteúdo de mtDNA observado, sendo indicativo da presença de disfunções mitocôndrias nas células de doentes poliQ que causem instabilidade genómica capaz de afetar a replicação e manutenção do mtDNA (Liu *et al.*, 2008).

Em 2009, Yu e colaboradores demonstraram com um modelo celular que células transfectadas com 78 repetições CAGs apresentavam uma redução na atividade antioxidante, associado a uma depleção do número de cópias de mtDNA e à presença de danos mitocondriais (deleção Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷ - marcador de idade e de stress oxidativo). Esta tendência para a depleção do número de cópias e para o aumento do número de deleções Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷ foi, posteriormente, confirmada por estes autores em sangue de 16 doentes, comparativamente a indivíduos saudáveis. De acordo com os autores, estas observações parecem sugerir uma atividade mitocondrial comprometida e um incremento da morte celular induzido por stress oxidativo

durante a progressão da DMJ (Yu *et al.*, 2009). No entanto, este trabalho apresentou um número reduzido de doentes analisados não tendo, para além disso, as variáveis clínicas dos mesmos em consideração.

Os resultados relativos à depleção mitocondrial na DMJ não são, todavia, consensuais. Num estudo de Zeng e colaboradores, não foi detetada a presença alterações mitocondriais, nomeadamente, a presença significativas de deleções Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷ ou de diferenças no número de cópias, na análise de uma família chinesa com 14 indivíduos portadores de SCA3 e 13 indivíduos não portadores, molecularmente confirmados (Zeng *et al.*, 2012).

Um estudo recente demonstrou a presença de atividade comprometida do complexo II da cadeia respiratória em modelos animais e celulares de DMJ, demonstrando uma alteração na atividade normal mitocondrial (Laço *et al.*, 2012).

Em um modelo animal, Kazachkova *et al.* (2013b) avaliaram as diferenças no número de cópias em diferentes tecidos (afetados e não afetados pela doença) e em diferentes estados da doença, relativamente a idade de início da doença. Foi reportada a presença de alterações no mtDNA mais evidentes em ratinhos (*Mus musculus*) transgênicos DMJ. Em particular, os autores referem uma depleção do número de cópias de mtDNA com a idade e a acumulação de deleções nos estados iniciais da doença em ratinhos transgênicos, comparativamente a não-transgênicos. Nas amostras de tecidos, verificaram uma diminuição no número de cópias e uma maior presença de deleções nas regiões do cérebro afetadas. Com base nos resultados obtidos, Kazachkova e colaboradores sugerem um aumento do stress oxidativo na presença da ataxina-3 mutada e uma relação entre o número relativo de deleções Δ mtDNA³⁸⁶⁷ (Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷ nos humanos) e o estado da doença. É mencionada, ainda, o potencial do estudo das alterações de mtDNA como biomarcador de início do fenótipo da DMJ.

1.1.4. As alterações mitocondriais como potenciais biomarcadores da doença de Machado-Joseph

Uma das maiores dificuldades inerentes à DMJ é a ausência de uma compreensão total do mecanismo subjacentes à sua patogenicidade, nomeadamente, o processo segundo o qual a ataxina-3 alterada induz a neurodegeneração. Atualmente, esta é uma doença que permanece

sem tratamento; porém têm sido desenvolvidos ensaios clínicos com compostos de interesse que visam a diminuição da intensidade de certos sintomas, manifestados durante o decurso da doença (revisto em Paulson, 2012). Um aspeto que pode comprometer o sucesso e desenvolvimento deste tipo de ensaios clínicos é ausência de meios de monitorização da progressão da doença e de métodos de deteção da ocorrência de benefícios terapêuticos subtis, uma vez que os biomarcadores atualmente em uso apenas detetam alterações reportadas pelo doente e/ou cuidador e em critérios avaliadas por profissionais com recurso a escalas de medida neurológicas, que os tornam subjetivos e suscetíveis a viés (revisto em Weir *et al.*, 2011).

Os biomarcadores são definidos como características biológicas que podem ser medidas e avaliadas objetivamente e que podem fornecer informações sobre os processos biológicos normais ou patogénicos, bem como respostas farmacológicas a intervenções farmacêuticas. De acordo com a *Biomarker Definitions Working Group*, um candidato a biomarcador deverá reunir os seguintes critérios: rápida e fácil quantificação em tecidos ou fluidos biológicos acessíveis através do uso de técnicas padronizadas, as quais podem ser reproduzidas por diferentes centros de estudo (*fide* Weir *et al.*, 2010).

Os biomarcadores clínicos atualmente utilizados consistem em escalas de medidas neurológicas padronizadas, que no caso da DMJ deverão ter em conta duas características complexas associadas a esta doença: a combinação qualitativa variável de diferentes sinais e sintomas; e a manifestação variável destes sinais e sintomas ao longo do tempo. As escalas mais usadas no estudo de ataxias (*International Cooperative Ataxia Rating Scale* –ICARS; e a *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* - SARA), apenas avaliavam uma dimensão específica deste tipo de doenças, não tendo em conta outros possíveis sintomas de interesse (Kieling *et al.*, 2008). É utilizada, ainda, a *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia* (NESSCA), esta escala apresenta uma metodologia mais abrangente baseada na determinação quantitativa de um exame neurológico padronizado, que foca as características principais das SCAs em geral e, em particular, da DMJ (Jardim *et al.*, 2010). No entanto a utilização de escalas em ensaios clínicos representa um método subjetivo e, usualmente, insensível a subtis mudanças em curtos períodos de tempo (revisto em Weir *et al.*, 2010).

Desde modo, a validação de biomarcadores objetivos e quantitativos de fácil aplicação representado uma área de estudo com um crescente interesse. Na DH, têm sido desenvolvidos vários estudos que visam o desenvolvimento de biomarcadores que sejam clinicamente válidos e capazes de avaliar a complexidade do fenótipo clínico e lenta progressão apresentado por esta

doença. Atualmente têm sido abordados diferentes biomarcadores clínicos, de neuroimagem estrutural e bioquímicos (revisto em Weir *et al.*, 2011)

Até ao momento, a identificação de biomarcadores moleculares na DMJ foi uma área pouco explorada. Recentemente, Saute e colaboradores analisaram o potencial da proteína *insulin growth factor binding protein 1* (IGFBP1) como biomarcador de estado da DMJ, tendo verificado a presença de níveis mais elevados da em doentes DMJ do que em controlos; além de níveis aumentados desta proteína em indivíduos DMJ com um número de repetições CAG superior (Saute *et al.*, 2011). Em outro estudo, Raposo e colaboradores identificaram 3 genes significativamente sobreexpressos em doentes DMJ, comparativamente com controlos; 2 genes apresentam potencial como biomarcadores de progressão, uma vez que, estavam significativamente sobreexpressos em doentes com uma curta duração da doença (mais perto da idade de início dos sintomas) comparativamente com doentes mais afastados da idade de início dos sintomas, sendo que estes apresentavam uma expressão semelhante aos controlos (Raposo *et al.*, in press).

Embora o estudo das alterações mitocondriais como potenciais biomarcadores moleculares na DMJ permaneça pouco estudado, como já anteriormente apontado, as evidências atuais sugerem que o número de cópias de DNA constitui um parâmetro de interesse e de importância biológica no desenvolvimento de biomarcadores capazes de avaliar estados patológicos da doença (biomarcadores de estado) e de acompanhar e avaliar a progressão da doença durante os diferentes estados desta (biomarcadores de progressão).

CAPÍTULO 2: SUJEITOS E MÉTODOS

2.1. SUJEITOS

No presente estudo foram utilizadas 75 amostras de DNA, pertencentes ao repositório de amostras biológicas do grupo de Epidemiologia e Genética Humana (EpiGene) do Centro de Investigação de Recursos Naturais (CIRN) da Universidade dos Açores. Do total de amostras utilizadas, 25 correspondem a amostras provenientes de indivíduos afetados com a doença de Machado-Joseph, molecularmente confirmados para a presença da mutação no gene *ATXN3*, e pertencentes a famílias açorianas com DMJ, para os quais o genótipo se apresentava disponível. As restantes 50 correspondem a indivíduos aparentemente saudáveis, molecularmente excluídos para a DMJ e selecionados de acordo com o género, naturalidade e idade à data de colheita (± 4 anos) de forma a garantir o emparelhamento de cada doente a dois controlos distintos. Para os doentes foram compilados os seguintes dados clínicos:

- Idade de início da doença: idade de aparecimento dos primeiros sintomas da doença, relatada pelo doente e/ou cuidador;
- Duração da doença: o tempo, em anos, decorridos entre a idade de início da doença e a idade à data de colheita da amostra.

2.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

2.2.1. PCR quantitativo em tempo real

A abordagem metodológica utilizada baseou-se na determinação relativa do número de cópias de mtDNA com recurso à técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (Bustin *et al.* 2009) com utilização de uma sonda marcada com fluorescência e um conjunto de *primers* específicos para o fragmento a amplificar (adaptado de Zeng *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2003). Neste procedimento utilizou-se um aparelho *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®), nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95 °C durante 10' seguida de 40 ciclos de 15" a 95 °C e 60" a 60 °C.

A determinação do número de cópias do gene *MT-ND1* (*mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1*) em cada uma das amostras analisadas foi efetuada segundo o protocolo *TaqMan® Copy Number Assays* (Applied Biosystems®), de acordo com as indicações do fabricante, especificadas no manual de utilização. O gene *Rnase P* (*ribonuclease P*) foi utilizado

como gene de referência e o gene *MT-ND1* como gene mitocondrial de interesse. Foram utilizados *primers* específicos (*forward* e *reverse*) para o gene *MT-ND1* e para o gene *Rnase P* em conjunto com uma sonda de fluorescência FAM™ e VIC®, respetivamente (Tabela 2).

A reação de amplificação foi efetuada em triplicado para cada amostra, numa placa de 96 poços, com as seguintes quantidades de reagentes: 10 µL de 2x *TaqMan*® *Genotyping Master Mix*; 1 µL de 20x *TaqMan*® *Copy Number Assay MT-DN1*; 1 µL de 20x *TaqMan*® *Copy Number Reference Assay RNase P*; 4 µL de DNA (5 ng/µL) e água tri-destilada e autoclavada de forma a perfazer um volume total de 20 µL.

Tabela 2 - *Primers* e condições utilizadas no qPCR para a determinação do número de cópias de mtDNA.

Gene	Condições
<i>MT-ND1</i>	<i>Primer forward</i> – CCCTAAAACCCGCCACATCT 95 °C – 10'
	<i>Primer reverse</i> – AGAGCGATGGTGAGAGCTAAGG 95 °C – 15''
	Sonda – FAM -ATCACCTCTACATCACCGCCCCG 60 °C – 60''
	} 40 ciclos

2.2.1.2. Determinação do número de cópias de mtDNA

A eficiência de amplificação para os genes utilizados (*Rnase P* e *MT-ND1*) foi obtida através da preparação de uma série de diluições, para cada um os genes, a partir uma solução *stock* de DNA controlo. Cada série foi composta por 6 diluições com as seguintes concentrações: 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 ng/µL. Estas diluições foram efetuadas com água tri-destilada e autoclavada, de acordo com a Tabela 3.

Cada uma das séries de diluição foi amplificada por qPCR e a média dos valores de *cycle threshold* (C_t) obtido foi utilizado para a elaboração das curvas de eficiência de cada um dos genes.

Tabela 3 - Diluições seriadas para a obtenção de soluções padrão para a elaboração da curva de eficiência.

	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Quantidade de DNA	8 μ L Sol. stock	2 μ L D1	2 μ L D2	2 μ L D3	2 μ L D4	2 μ L D5
Quantidade de água	12 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L

A eficiência (E) do qPCR foi calculada através da seguinte equação:

$$E = 10^{\left[\frac{-1}{\text{declive}}\right]}, \text{ onde o declive é obtido através da equação da reta}$$

Em seguida, foi calculado o número de cópias de mtDNA em relação ao DNA nuclear, segundo o método de correção da eficiência, anteriormente descrito por Pfaffl (2001):

$$\text{rácio} = \frac{E(\text{alvo})^{-Ct(\text{alvo})}}{E(\text{endógeno})^{-Ct(\text{endógeno})}}$$

$$= \frac{1,9097^{-(Ct \text{ MT-ND1})}}{1,9321^{-(Ct \text{ RnaseP})}}$$

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi efetuada com recurso ao programa IBM SPSS v. 20.0 (IBM Corp., 2011), sendo um valor de p inferior a 0,05 considerado como estatisticamente significativo.

Numa fase inicial, procedeu-se à caracterização geral da amostra, de modo a determinar as médias e frequências das variáveis em análise. De seguida, testou-se a distribuição normal das variáveis.

A regressão linear simples foi usada para estimar a relação linear existente entre a idade de início dos sintomas e o número de repetições CAGs do alelo expandido dos indivíduos DMJ.

De modo a averiguar as diferenças entre as médias obtidas para os grupos de casos e controlos recorreu-se a testes paramétricos (ANCOVA, teste t de Student para amostras emparelhadas) e não paramétricos (teste de *Mann-Whitney U*). O teste estatístico ANCOVA permite controlar o efeito de co-variáveis que estão previamente correlacionadas com a variável dependente, como por exemplo: (1) controlar o efeito da idade à colheita da amostra do indivíduo sobre o número de cópias de mtDNA; e (2) anular o efeito do número de CAGs no alelo expandido na idade de início.

O teste t de Student para amostras emparelhadas foi utilizado para comparar o número de cópias de mtDNA entre o grupo de doentes e dois diferentes sets de controlos, emparelhados de acordo com a idade à colheita da amostra e género.

Dentro do grupo dos casos, a correlação parcial foi utilizada para calcular a correlação entre a razão do número de cópias de mtDNA e as diferentes variáveis clínicas em análise (idade de início, número de repetições CAG no alelo expandido e duração da doença), tendo em consideração o efeito da idade à colheita do indivíduo.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. CARATERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA DA AMOSTRA

O grupo de doentes analisados nesta amostra é constituído por 13 homens e 12 mulheres, com um intervalo de idades compreendido entre os 26 e os 66 anos de idade ($45,96 \pm 12,27$, média \pm desvio padrão, DP; Fig.3). Quanto à naturalidade, 15 indivíduos são naturais da ilha de São Miguel, 7 das Flores, 2 da Graciosa e 1 da Terceira (Fig.1).

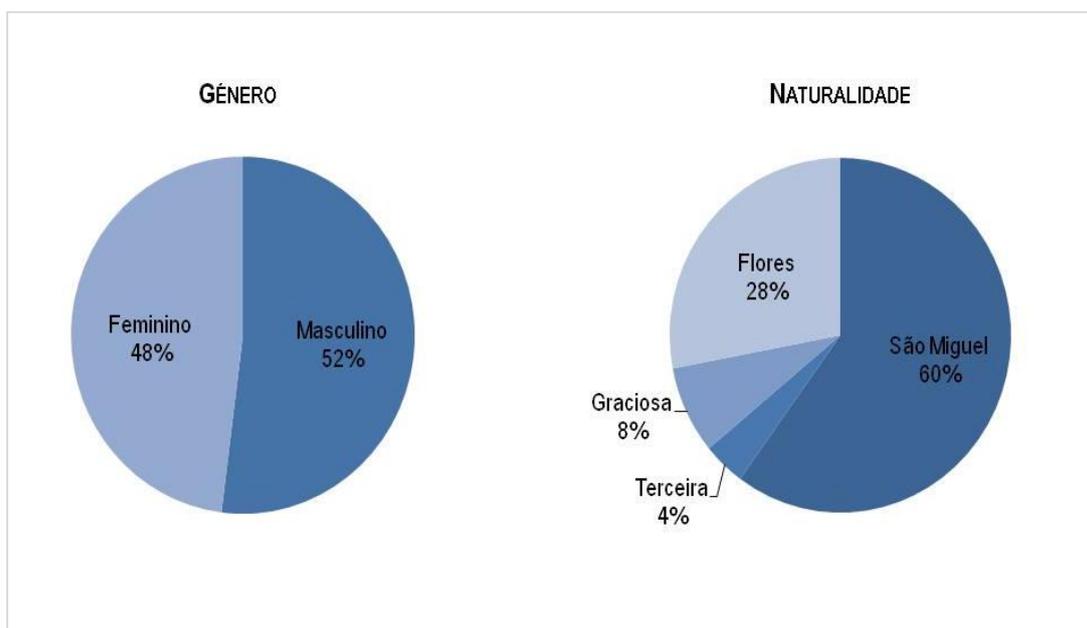


Fig. 1 - Distribuição dos doentes quanto ao género e à naturalidade (N=25).

Por sua vez, o grupo de controlos analisados consiste em 26 homens e 24 mulheres, que apresentam um intervalo de idades entre os 22 e os 70 anos de idade ($45,80 \pm 12,64$; Fig.3); 34 indivíduos são naturais da ilha de São Miguel, 10 da Graciosa, 4 das Flores, 1 de Santa Maria e 1 da Terceira (Fig.2).

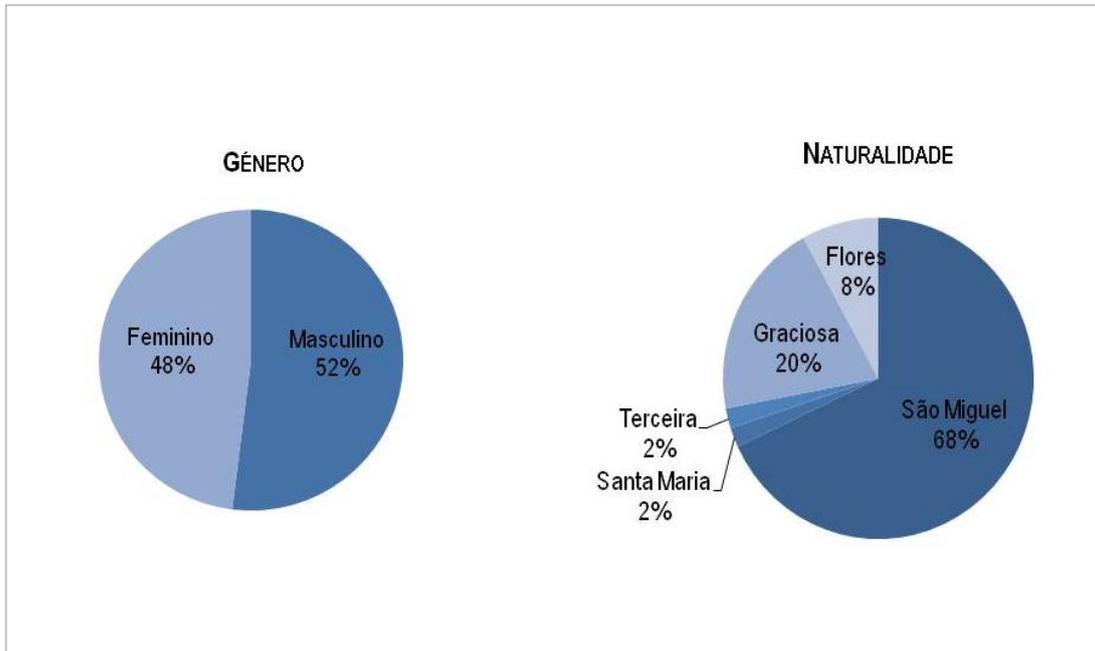


Fig. 2 - Distribuição dos controlos quanto ao género e à naturalidade (N=50).

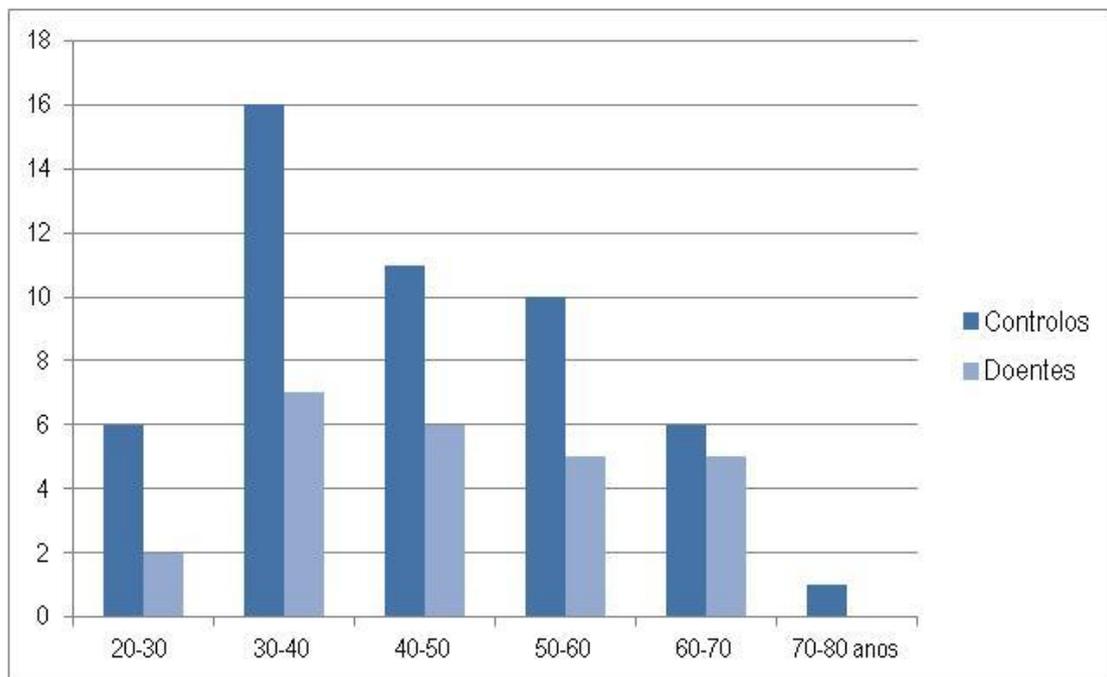


Fig. 3 - Distribuição de idades dos indivíduos em estudo (N=75)

3.2. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DOS DOENTES

Dentro do grupo dos doentes analisados (N=25), a média de idades de início dos primeiros sintomas foi de 34,52 (\pm 9,72), com um mínimo de 20 e um máximo de 56 anos de idade (Fig. 4).

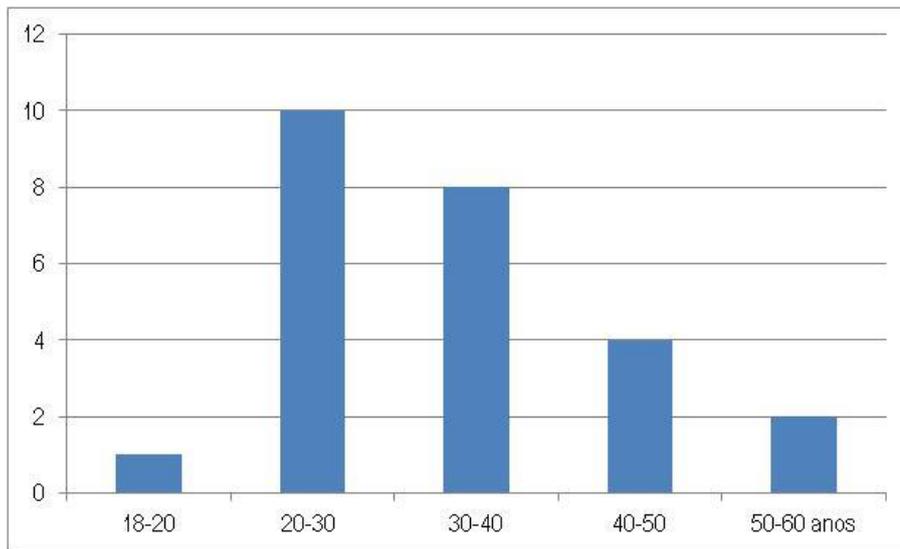


Fig. 4 - Distribuição das idades de início nos doentes (N=25).

No referido grupo, a duração da doença foi determinada apresentando um valor médio de 11,44 \pm 8,48 anos, com um mínimo de 0 anos e um máximo de 34 anos.

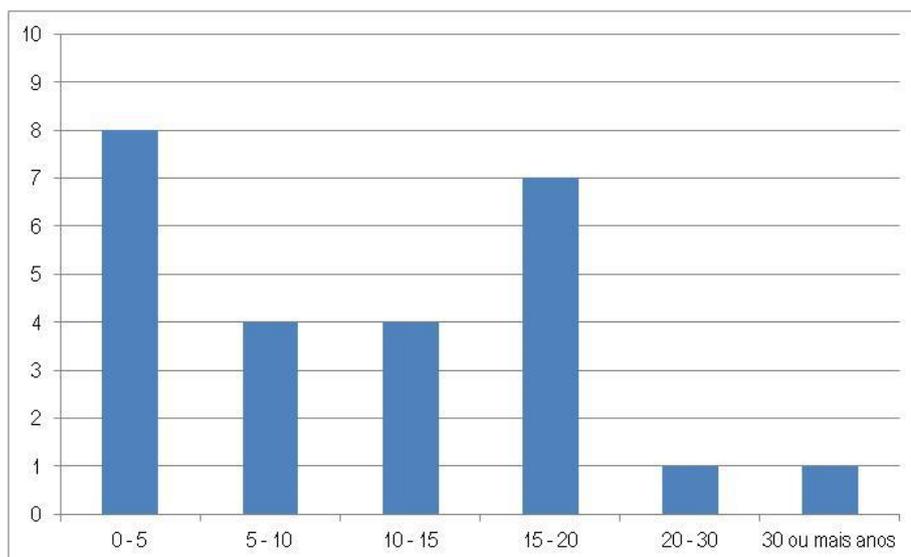


Fig. 5 - Distribuição da duração da doença nos doentes (N=25).

As frequências alélicas dos doentes são apresentadas na Figura 6.

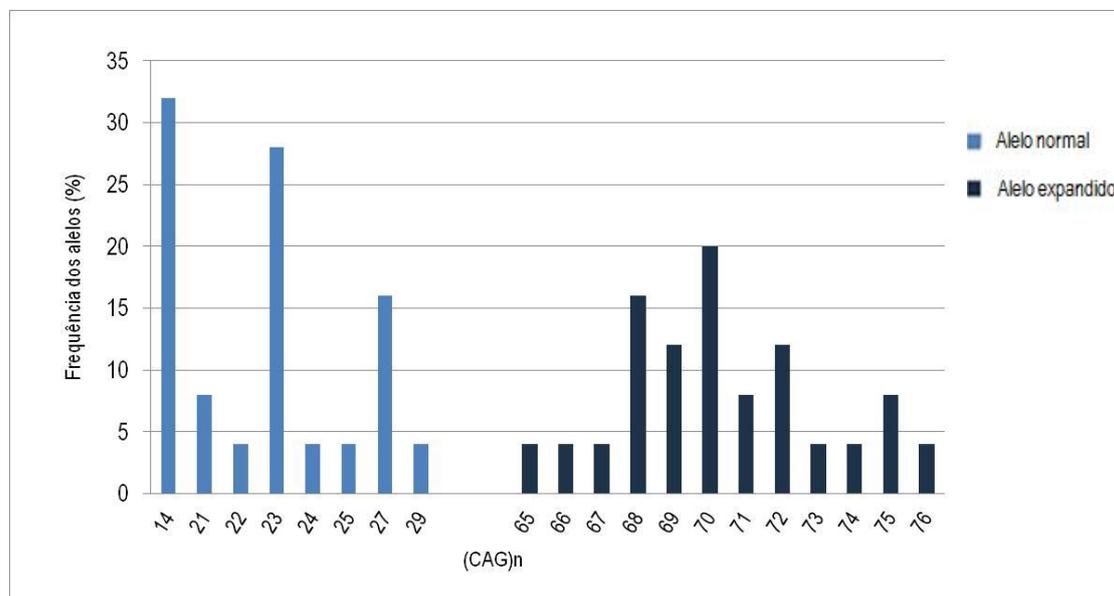


Fig. 6 - Frequências alélicas no locus *ATXN3* dos doentes estudados (N=50 cromossomas).

Os alelos normais encontram-se dentro da amplitude reportada (12 – 44 repetições) (Maciel *et al.*, 2011), apresentando um mínimo de 14 repetições e um máximo de 29 e uma média de $20,92 \pm 5,22$, com os alelos 14 (32%) e 23 (28%) a serem os mais frequentes.

No presente grupo de casos analisado, os alelos expandidos encontraram-se dentro da amplitude esperada (Maciel *et al.*, 2011), apresentando um mínimo de 65 repetições e um máximo de 76, com uma média de $70,32 \pm 2,82$, sendo os alelos mais frequentes a serem o 68 (16%) e o 70 (20%).

Nesta série de doentes, foi observada uma correlação negativa entre o número de repetições CAG no alelo expandido e a idade de início dos sintomas ($r=-0,727$; $p<0,05$) (Fig.7); o tamanho de repetições no alelo expandido explica cerca de 53% da variação da idade de início ($r^2=0,527$; $p<0,05$) (Fig. 7). Estes resultados encontram-se de acordo com o estudo publicado anteriormente por Bettencourt *et al.* (2008), que refere a presença de uma correlação negativa ($r=-0,682$; $r^2=0,465$) entre o número de repetições CAG e a idade de início, com 45% da variação a ser explicada pelo tamanho do alelo expandido.

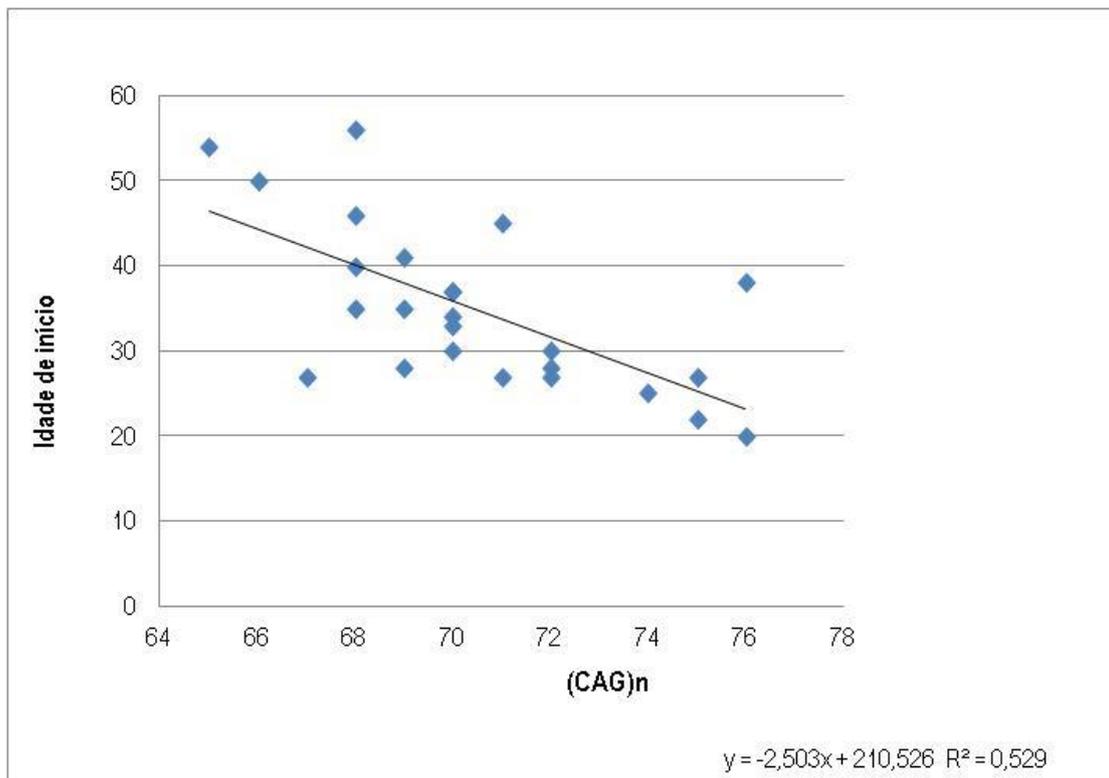


Fig. 7 - Associação entre o número de repetições CAG no alelo expandido e da idade de início dos sintomas na série de doentes em estudo.

3.3. ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA EM AMOSTRAS DE DOENTES DE MACHADO-JOSEPH

O número médio de cópias do grupo de doentes DMJ foi de $21,48 \pm 3,26$, com um mínimo de 12,56 e um máximo de 39,90. Dentro do grupo de controlos (N=50), a média obtida para o número de cópias foi de $35,13 \pm 2,31$, com um mínimo de 10,72 e um máximo de 95,40. No que diz respeito ao número de cópias foi verificada a presença de diferenças significativas entre os dois grupos estudados (Mann-Whitney test; $U=295,000$; $p<0,0001$), com os indivíduos DMJ a apresentarem, em média, um número de cópias de mtDNA inferior aos controlos. O resultado anterior foi confirmado quando se teve em consideração a idade de cada indivíduo aquando da colheita. (ANCOVA; $F=11,688$; $p=0,001$).

Para controlar o efeito de variáveis como a idade do indivíduo à colheita e o género, procedeu-se ao emparelhamento de cada caso a dois controlos distintos, selecionados de acordo com a faixa etária e género do doente. Desde modo, foram criados dois grupos de

controles: o *set* 1 é constituído por 13 homens e 12 mulheres (N=25) com uma média de idades $46,88 \pm 2,41$; o *set* 2 é constituído por 13 homens e 12 mulheres (N=23) com uma média de idades de $44,72 \pm 2,67$. Foi detetada a presença de diferenças significativas entre o número de cópias de mtDNA entre os doentes e cada um dos dois conjuntos de controlos analisados, no *set* 1 (paired t-test; $t=-3,645$; $p=0,001$) e no *set* 2 (paired t-test; $t=-3,313$; $p=0,003$), respetivamente.

O número de cópias de mtDNA tem sido analisado em diversos estudos (Tabela 4); contudo a utilização de diferentes metodologias não permite estabelecer, na maioria dos casos, comparações diretas. No entanto, refere-se um estudo elaborado por Bonomi e colaboradores, no qual foi determinado o número de cópias de DNA mitocondrial em mulheres com envelhecimento prematuro dos ovários. Neste estudo, a metodologia utilizada é idêntica à aqui apresentada, sendo que valores obtidos variaram entre os $28,65 \pm 1,8$ para mulheres que apresentavam envelhecimento prematuro dos ovários e os $52,4 \pm 6,6$ para mulheres com resposta baixa à estimulação ovárica; o valor obtido em mulheres que apresentavam ovários intactos (controlos) foi de $176 \pm 18,4$. Os resultados obtidos no presente estudo encontram-se dentro do intervalo esperado, utilizando especificamente esta metodologia.

Tabela 4 – Valores obtidos para o número de cópias mtDNA em amostras de sangue de casos e controlos em estudos de diferentes doenças.

Referência Bibliográfica	Casos	Controlos	Doença
Liu <i>et al.</i> , 2008	525 ± 66	804 ± 272	SCA3
Liu <i>et al.</i> , 2008	435 ± 130	804 ± 272	SCA2
Liu <i>et al.</i> , 2008	307 ± 28	804 ± 272	SBMA
Liu <i>et al.</i> , 2008	232 ± 48	804 ± 272	DH
Shen <i>et al.</i> , 2008	4% a 15% mais elevado do que o valor reportado para os controlos	117 ± 32	Exposição ocupacional a benzeno
Su <i>et al.</i> , 2010	110 ± 48	324 ± 182	SBMA
Bonomi <i>et al.</i> , 2012	$28,65 \pm 1,8$ $52,4 \pm 6,6$	$176 \pm 18,4$	Envelhecimento prematuro ovariano
He <i>et al.</i> , 2014	$4,4 \pm 6,10$	$4,1 \pm 5,38$	Depressão em jovens adultos

3.3. INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CÓPIAS DE mtDNA NA IDADE DE INÍCIO, NÚMERO DE REPETIÇÕES DO ALELO EXPANDIDO E DURAÇÃO DA DOENÇA DE DOENTES MACHADO-JOSEPH

Uma possível associação entre o número de cópias de mtDNA e a idade de início dos sintomas foi testada utilizando uma correlação parcial (ajustando a idade à colheita do doente); não foram observadas diferenças entre o número de cópias e a idade de início da doença (partial corr; $r=0,043$; $p=0,841$). Posteriormente, os doentes foram divididos em dois grupos: doentes com idade de início precoce – doentes que reportaram os primeiros sintomas antes dos 34 anos, inclusive (mediana da série em estudo); e doentes com idade de início mais tardio - doentes que reportaram os primeiros sintomas depois dos 34 anos. Deste modo, os indivíduos que apresentaram uma idade de início mais precoce ($n=14$) apresentaram um número médio de cópias de $20,768 \pm 2,23$, enquanto indivíduos com um início mais tardio ($n=11$) apresentaram um número médio de cópias de $22,386 \pm 2,61$. As diferenças entre as médias ajustadas não foram estatisticamente significativas (ANCOVA; $F=0,690$; $p=0,415$).

Para a presente série de doentes, não se verificou uma correlação estatisticamente significativa entre o número de cópias e a duração da doença (partial corr; $r=-0,043$; $p=0,841$). Os doentes foram posteriormente divididos em dois grupos: doentes com uma duração da doença curta - doentes com uma duração da doença igual ou inferior a 10 anos (mediana da série em estudo); e doentes com um período de duração da doença longa – doentes com uma duração da doença superior aos 10 anos. Os indivíduos que apresentaram uma duração igual ou inferior a 10 anos ($n=13$) apresentaram um número médio de cópias de $21,578 \pm 2,15$, enquanto indivíduos com maior duração da doença ($n=12$) obtiveram um valor médio de cópias de $21,374 \pm 2,25$, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias ajustadas para a idade do doente à colheita (ANCOVA; $F=0,002$; $p=0,964$).

Para testar uma possível associação entre o número de repetições CAG no alelo expandido e o número de cópias, foi feita uma correlação parcial, a qual não foi estatisticamente significativa (partial corr; $r=0,109$; $p=0,612$). Dois grupos de doentes foram criados: doentes que apresentavam o alelo expandido menor – doentes com um número de repetições CAG inferior ou igual a 70 repetições (mediana da série em estudo); e doentes com o alelo expandido maior – doentes com um número de repetições CAG superior a 70. Para o grupo com um alelo expandido menor ($n=15$), a média obtida foi número de cópias foi de $21,41 \pm 1,98$ e de $21,58 \pm$

2,49 para os doentes com alelo maior (n=10). As diferenças encontradas entre os dois grupos não foram estatisticamente significativas (ANCOVA; $F=0,001$; $p=0,975$).

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo pretendeu confirmar a presença de alterações significativas do número de cópias de mtDNA, em amostras de sangue de doentes DMJ. Dentro do grupo dos doentes pretendeu-se, ainda, correlacionar o número de cópias do mtDNA com os diferentes dados.

No que concerne à distribuição dos alelos normais no locus *ATXN3*, os resultados obtidos (média de $20,92 \pm 5,22$, com as variantes mais frequentes a serem a 14 e 23), são consistentes com os obtidos no estudo de Lima *et al.* (2005), no qual foi analisado o número de repetições em indivíduos portugueses não portadores da DMJ, tendo sido reportada uma média de $21,5 \pm 5,0$, com os alelos 14 e 23 a serem as variantes mais frequentes. Noutro estudo realizado na população açoriana por Bettencourt *et al.* (2008), foi obtida uma média de 21,98, com uma amplitude entre as 14 e 39 repetições. No presente grupo de casos analisado, os alelos expandidos encontraram-se dentro da amplitude esperada (mínimo de 65 repetições e máximo de 76; média de $70,32 \pm 2,82$; alelos 68 e a 70 mais frequentes). Este resultado encontra-se de acordo com os resultados reportados por vários autores, entre os quais Maciel *et al.* (1995).

Para esta série de doentes, foi observada uma correlação negativa entre o número de repetições CAG no alelo expandido e a idade de início dos sintomas; o tamanho de repetições no alelo expandido explica 53% da variação da idade de início ($r^2=0,527$; $p<0,05$). Estes resultados encontram-se de acordo com o estudo publicado anteriormente por Bettencourt *et al.* (2008), que refere a presença de uma correlação negativa ($r=-0,682$; $r^2=0,465$) entre o número de repetições CAG e a idade de início, com 45% da variação a ser explicada pelo tamanho do alelo expandido. Esta relação encontra-se bem estabelecida, explicando, de acordo com a série de doentes em estudo, entre cerca de 45% (Maciel *et al.*, 1995) e 75% (Ranum *et al.*, 1995) da variação da idade de aparecimento dos primeiros sintomas.

O presente estudo permitiu ainda confirmar que o número de cópias do mtDNA está alterado em amostras de sangue de doentes, verificando-se uma diminuição significativa comparativamente aos controlos. A presença de depleção do número de cópias de mtDNA em doentes DMJ foi reportada em estudos anteriores (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009). Este decréscimo foi também observado em indivíduos portadores de outras doenças poliQ, nomeadamente, SCA2, doença de Huntington e atrofia muscular espino-bulbar (Liu *et al.*, 2008; Su *et al.* 2010).

Na DMJ, Liu e colaboradores demonstrou uma depleção significativa no número de cópias de mtDNA em doentes poliQ, entre as quais a DMJ, em relação em indivíduos saudáveis. De acordo com os resultados obtidos, os autores propuseram que o stress oxidativo podia estar na base da diminuição do conteúdo de mtDNA observado (Liu *et al.*, 2008).

Em outro estudo, Yu e colaboradores demonstraram com um modelo celular que células transfectadas com 78 repetições CAGs apresentavam uma redução na atividade antioxidante, associado a uma depleção do número de cópias de mtDNA. Esta tendência para a depleção do número de cópias foi, em seguida, confirmada por estes autores em sangue de 16 doentes, comparativamente a indivíduos saudáveis. De acordo com os autores, estas observações parecem sugerir uma atividade mitocondrial comprometida e um incremento da morte celular induzido por stress oxidativo durante a progressão da DMJ (Yu *et al.*, 2009).

Utilizando um modelo animal, Kazachkova e colaboradores (2013b) avaliaram as diferenças no número de cópias em diferentes tecidos (afetados e não afetados pela doença) e em diferentes estados da doença, relativamente à idade de início da doença. Os autores reportaram a presença de alterações no mtDNA mais evidentes em ratinhos (*Mus musculus*) transgênicos DMJ, nomeadamente, a depleção do número de cópias de mtDNA com a idade e a acumulação de deleções nos estados iniciais da doença. Com base nos resultados obtidos, Kazachkova e colaboradores sugerem um aumento do stress oxidativo em células na presença de gene *ATXN3* mutado e uma relação entre o número relativo de deleções $\Delta\text{mtDNA}^{3867}$ e o estado da doença. É apontado o potencial do estudo das alterações de mtDNA como biomarcador de início do fenótipo da DMJ.

Contudo, para o presente estudo não foi possível verificar a presença de uma correlação significativa entre as diferentes variáveis clínicas (idade de início e duração da doença) e genéticas (número de repetições CAGs) analisadas e o número de cópias de mtDNA, mas tratando-se de um estudo piloto, o tamanho amostral poderá não ser suficiente para obter poder estatístico.

Desde modo, os resultados obtidos neste estudo são sugestivos da importância da determinação do número de cópias como um promissor biomarcador de estado da DMJ; no entanto não foi possível confirmar o potencial deste como biomarcador de progressão. Estes resultados deverão ser confirmados numa série maior de doentes e controlos.

CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo M. 2012. *Geographic profiling of Machado -Joseph disease: a health geography pilot – study in the Azores*. Tese de Mestrado. Universidade dos Açores 68pp.
- Baron M, Kudin AP, Kunz WS. 2007. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochemical Society transactions* 35: 1228-31
- Bettencourt C, Fialho RN, Santos C, Montiel R, Bruges-Armas J, Maciel P & Lima M. 2008. Segregation distortion of wild type alleles at the Machado-Joseph disease locus: a study in normal families from the Azores islands (Portugal). *Journal of Human Genetics*, 53(4):333-9
- Bettencourt C, Lima M. 2011. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis* 6: 35
- Bonomi M, Somigliana E, Cacciatore C, Busnelli M, Rossetti R *et al.* 2012. Blood cell mitochondrial DNA content and premature ovarian aging. *PLoS ONE* 7(8): e42e23
- Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB. 2008. Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends in neurosciences* 31: 609-16
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, *et al.* 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55: 611-22
- Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, Imamura EU, Speck-Martins CE. 2008. Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatric neurology* 38: 296-9
- Costa C, Paulson HL. 2012. Toward understanding Machado-Joseph disease. *Progress in neurobiology* 97: 239-57
- Coutinho P. 1992. *Doença de Machado-Joseph: Tentativa de Definição*. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. 247 pp
- Evers MM, Toonen LJ, van Roon-Mom WM. 2013. Ataxin-3 Protein and RNA Toxicity in Spinocerebellar Ataxia Type 3: Current Insights and Emerging Therapeutic Strategies. *Molecular neurobiology*

- He Y, Tang J, Li Z, Li H, Liao Y, Tang Y *et al.* 2014. Leukocyte mitochondrial DNA copy number in blood is not associated with major depressive disorder in young adults. *PLoS ONE* 9(5): e96869
- IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jardim LB, Hauser L, Kieling C, Saute JA, Xavier R, *et al.* 2010. Progression rate of neurological deficits in a 10-year cohort of SCA3 patients. *Cerebellum* 9: 419-28
- Jenkins BG, Andreassen OA, Dedeoglu A, Leavitt B, Hayden M *et al.* 2005. Effects of CAG repeat length, HTT protein length and protein context on cerebral metabolism measured using magnetic resonance spectroscopy in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurochem* 95: 553–562
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, *et al.* 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature genetics* 8: 221-8
- Kazachkova N, Ramos A, Santos C, Lima M. 2013a. Mitochondrial DNA damage patterns and aging: revising the evidences for humans and mice. *Aging and disease* 4: 337-50
- Kazachkova N, Raposo M, Montiel R, Cymbron T, Bettencourt C, *et al.* 2013b. Patterns of mitochondrial DNA damage in blood and brain tissues of a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease. *Neuro-degenerative diseases* 11: 206-14
- Kieling C, Rieder CRM, Silva ACF, Saute JAM, Cecchin CR, *et al.* 2008. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *European Journal of Neurology* 15:371–376
- Laço MN, Oliveira CR, Paulson HL, Rego AC. 2012. Compromised mitochondrial complex II in models of Machado-Joseph disease. *Biochimica et biophysica acta* 1822: 139-49
- Lima M, Bruges-Armas J, Bettencourt C. 2012. Non-Mendelian Genetic Aspects in Spinocerebellar Ataxias (SCAS): The Case of Machado-Joseph Disease (MJD), *Spinocerebellar Ataxia*, Dr. José Gazulla (Ed.). InTech. 198 pp
- Lima M, Costa MC, Montiel R, Ferro A, Santos C, Silva C, Bettencourt C, Sousa A, Sequeiros J, Coutinho P and Maciel P. 2005. Population Genetics of Wild-Type

- CAG Repeats in the Machado-Joseph Disease Gene in Portugal. *Human Heredity* 60:156-163.
- Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-95
- Liu CS, Cheng WL, Kuo SJ, Li JY, Soong BW, Wei YH. 2008. Depletion of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with poly-Q diseases. *Journal of the neurological sciences* 264: 18-21
- Liu CS, Tsai CS, Kuo CL, Chen HW, Lii CK, *et al.* 2003. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free radical research* 37: 1307-17
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, *et al.* 1995. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *American journal of human genetics* 57: 54-61
- Paulson H. 2012. Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handbook of clinical neurology* 103: 437-49
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45
- Ranum LP, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman S, *et al.* 1995. Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive, or sporadic ataxia. *American journal of human genetics* 57: 603-8
- Raposo M, Bettencourt C, Maciel P, Gao F, Ramos A *et al.* 2015. Novel candidate blood-based transcriptional biomarkers of Machado-Joseph disease (*in press*)
- Saute JA, da Silva AC, Muller AP, Hansel G, de Mello AS, *et al.* 2011. Serum insulin-like system alterations in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26: 731-5
- Schapira AHV. 2006. Mitochondrial disease. *The Lancet* 368: 70-82

- Shen M, Zhang L, Bonner MR, Liu CS, Li G, Vermeulen R *et al.* 2008. Association between mitochondrial DNA copy number, blood cell counts and occupational benzene exposure. *Environ Mol Mutagen* 49(6): 453-457
- Su S, Jou S, Cheng W, Lin T, Li J, *et al.* 2010. Mitochondrial DNA damage in spinal and bulbar muscular atrophy patients and carriers. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 411: 626-30
- van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, *et al.* 2002. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58: 702-8
- Weir DW, Sturrock A, Leavitt BR. 2011. Development of biomarkers for Huntington's disease. *The Lancet. Neurology* 10: 573-90
- Yu YC, Kuo CL, Cheng WL, Liu CS, Hsieh M. 2009. Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *Journal of neuroscience research* 87: 1884-91
- Zapico SC, Ubelaker DH. 2013. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging and disease* 4: 364-80
- Zeng A, Liu X, Shen L, Li W, Ding Z, *et al.* 2012. Analysis of mitochondrial DNA variations in a Chinese family with spinocerebellar ataxia. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 19: 60-4