UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Felippe Henrique Zuccolotto dos Reis

**Estudo da cadeia transportadora de elétrons na intolerância ao
exercício decorrente de deleções múltiplas no DNA mitocondrial**

**Ribeirão Preto
2019**

Felippe Henrique Zuccolotto dos Reis

Estudo da cadeia transportadora de elétrons na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas no DNA mitocondrial

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Programa: Medicina (Neurologia)

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zuccolotto dos Reis, Felipe Henrique

Estudo da cadeia transportadora de elétrons na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas no DNA mitocondrial.

Ribeirão Preto, 2019.

100 f. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicina (Neurologia)

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira

1. Intolerância ao exercício, 2. Doença mitocondrial, 3. Mitocôndria, 4. Cadeia transportadora de elétrons, 5. Consumo de O₂

FOLHA DE APROVAÇÃO

Zuccolotto dos Reis, F. H. Estudo da cadeia transportadora de elétrons na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas no DNA mitocondrial.

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Programa: Medicina (Neurologia)

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Ferreira
da Rosa Sobreira

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Plínio e Neífla, pelo apoio e amor incondicional

À minha namorada Larissa, por ser minha companheira em todos os momentos da minha vida. Te amo!

À Profa. Dra. Cláudia e seus pacientes, pelo exemplo, aprendizado, dedicação e colaboração neste momento de crescimento profissional e pessoal, sobretudo nos aspectos éticos e humanitários

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Para a minha filha Melissa, minha inspiração e dedicação

À minha irmã Flávia e seu marido Wade pelo apoio

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES),
pelo apoio financeiro mensal (Código de Financiamento 001) que nunca falhou,
mesmo em tempos de crise

AGRADECIMENTOS

À toda minha família Zuccolotto, pela ajuda e tradição de honestidade, humildade e coragem

De igual importância minha família Pissolatti dos Reis, a qual sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida

À Dra. Silvia Helena, pela importante ajuda nos desafios técnicos dos experimentos, além da agradável convivência e aprendizado profissional

À todos os funcionários do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, especialmente Aracy, Renato e Thaisa pela participação direta neste trabalho

À Profa. Dra. Luciane Alberici, por me proporcionar todas as condições necessárias para a padronização da técnica de consumo de O₂

À Profa. Dra. Enilza e sua aluna Jackeline, pela ajuda nos desafios ultramicroscópicos

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME), pelo relevante trabalho técnico em microscopia eletrônica

Ao Prof. Geraldo Cássio pela orientação nos testes estatísticos

Ao Prof. Dr. Norberto Coimbra, pela orientação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)

Aos amigos e amigas do laboratório Marjory, Bruno, Fernanda, Bianca, Anderson, pela convivência e troca de experiências profissionais

Aos meus amigos de longa data que me acompanharam durante esta jornada

RESUMO

ZUCCOLOTTO DOS REIS, Felipe Henrique. **Estudo da cadeia transportadora de elétrons na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas no DNA mitocondrial**. 2019. 99 páginas. Tese (Doutorado em Medicina [Neurologia]) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Intolerância ao exercício (IE) é a incapacidade de desempenhar atividade física normalmente, ocorrendo sintomas como mialgia e fadiga precoce, mesmo em resposta a exercícios relativamente leves. A importância deste trabalho está no fato de que a IE é um problema frequente na prática clínica, que resulta em marcante incapacidade física em decorrência da dificuldade no estabelecimento de sua etiologia, e consequentemente no adequado manejo dos sintomas. A elucidação das suas bases fisiopatológicas tem papel potencial no estabelecimento de uma abordagem terapêutica mais efetiva. Objetivamos avaliar a repercussão das deleções múltiplas no DNA mitocondrial (mtDNA) no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (CTE) em pacientes com IE. Selecionamos três grupos de pacientes: 13 pacientes com IE e deleções múltiplas no mtDNA formaram o grupo de IE; dois pacientes com encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (MELAS) e mutação 3243A>G, e mais dois pacientes com oftalmoplegia externa progressiva (PEO) e deleção única no mtDNA constituíram o grupo de pacientes com doença mitocondrial (DM); sete pacientes que tiveram o diagnóstico de DM descartado e sem indícios de disfunção mitocondrial formaram o grupo controle. Os dados clínico-laboratoriais foram obtidos do prontuário médico. Os fragmentos das biópsias foram analisados por histopatologia, por ensaios enzimáticos via espectrofotômetro e fluorímetro, e pelo consumo de O₂ da CTE via eletrodo de alta resolução. Os achados à biópsia muscular dos pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA consistiram de anormalidades discretas e em geral inespecíficas, porém a maioria dos pacientes apresentou fibras com aumento subsarcolemal de mitocôndrias. Os ensaios enzimáticos demonstraram redução de 24% a 40% a atividade dos complexos da CTE. O consumo de O₂ foi padronizado em homogeneizados de biópsias congeladas, utilizando o protocolo com adição sequencial do citocromo c, do NAD⁺,

do malato e do acetil CoA como substratos, e da rotenona, do malonato e da antimicina A como inibidores, pois foi o que demonstrou maior reprodutibilidade. Os pacientes IE tiveram uma redução significativa no consumo de O_2 da CTE quando comparado ao grupo controle. O consumo de O_2 e as atividades enzimáticas de cada complexo da CTE estudados separadamente correlacionaram-se positivamente. Estes dados juntamente com o exame clínico-laboratorial confirmaram o efeito prejudicial das deleções múltiplas no mtDNA na função mitocondrial dos pacientes com IE.

Palavras-chave: Intolerância ao exercício; Doença mitocondrial; Mitocôndria; Cadeia transportadora de elétrons; Consumo de O_2 .

ABSTRACT

ZUCCOLOTTO DOS REIS, F.H. **Electron transport chain study on exercise intolerance resulting from multiple deletions in mitochondrial DNA.** 2019. 99 pages. Thesis (PhD) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Exercise intolerance (EI) is the inability to perform physical activity normally, occurring symptoms such as myalgia and early fatigue, even in response to relatively light exercise. The importance of this work is the fact that EI is a frequent problem in clinical practice, which results in marked physical incapacity due to the difficulty in establishing its etiology, and consequently in the appropriate management of symptoms. The elucidation of its pathophysiological bases has a potential role in establishing a more effective therapeutic approach. We aimed to evaluate the repercussion of multiple deletions in mitochondrial DNA (mtDNA) on the electron transport chain (ETC) in patients with EI. We selected three groups of patients: 13 patients with EI and multiple deletions in mtDNA formed the EI group; two patients with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) with 3243A> G point mutation, and two patients with progressive external ophthalmoplegia (PEO) and single deletion in mtDNA constituted the group of patients with mitochondrial disease (MD); seven patients who had the diagnosis of DM discarded and without evidence of mitochondrial dysfunction formed the control group. Clinical-laboratory data were obtained from the medical records. Biopsy specimens were analyzed by histopathology, by enzymatic assays using a spectrophotometer and a fluorimeter, and by the O₂ consumption of the ETC using high resolution electrode. The muscle biopsy findings of the patients with EI and multiple mtDNA deletions consisted of discrete and generally nonspecific abnormalities, but the majority of patients presented fibers with a subarcolemal increase of mitochondria. The enzymatic assays demonstrated a reduction of 24% to 40% in the activity of the ETC complexes. O₂ consumption was standardized in frozen biopsy homogenates, using the protocol with sequential addition of cytochrome c, NAD⁺, malate and acetyl CoA as substrates, and rotenone, malonate and antimycin A as inhibitors, with high reproducibility. EI patients had a significant

reduction in ETC O_2 consumption when compared to the control group. O_2 consumption and the enzymatic assays of each ETC complex correlated positively. These data together with the clinical-laboratory examination confirmed the deleterious effect of multiple deletions in mtDNA on the mitochondrial function of EI patients.

Key words: Exercise intolerance; Mitochondrial disease; Mitochondria; Electron transport chain; O_2 consumption.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP- adenosina-5'-difosfato

ANEM- Ambulatório de Doenças Neuromusculares

ATP- adenosina trifosfato

AVC- acidente vascular cerebral

BSA- albumina de soro bovino

CI, CII, CIII, CIV, CV- complexos I, II, III, IV e V

Ca²⁺- cálcio

CaCl₂- cloreto de cálcio

CO₂- gás carbônico

CoA- coenzima A

COX- citocromo c oxidase

CTE- cadeia transportadora de elétrons

CS- citrato sintase

DM- doenças mitocondriais

DTT- *dithiothreitol*

DNA- ácido desoxirribonucleico

EDTA- *ethylenediamine tetraacetic acid*

EGTA- *ethylene glycol tetraacetic acid*

EROs- espécies reativas ao oxigênio

FAD⁺- dinucleotídeo de flavina e adenina (estado oxidado)

FADH₂- dinucleotídeo de flavina e adenina (estado reduzido)

Fe²⁺- ferro (estado ferroso)

Fe-Cu- centro de ferro-cobre

Fe-S- centro de ferro-enxofre

FMN- mononucleotídeo de flavina

GTP- guanosina trifosfato

HC-FMRP-USP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

H⁺ - próton

H₂O- água

H₂O₂- peróxido de hidrogênio

HEPES- *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

IE- intolerância ao exercício

KCN- cianeto de potássio

KCl- cloreto de potássio

KH₂PO₄- di-hidrogenofosfato de potássio

KMES- *2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid potassium salt*

MELAS- encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral, do inglês *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*.

MET- microscopia eletrônica de transmissão

MgCl₂- cloreto de magnésio

MgSO₄- sulfato de magnésio

n- número de indivíduos

NaCl- cloreto de sódio

NAD⁺- nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADH- nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

NaHCO₃- bicarbonato de sódio

O₂- oxigênio molecular

OsO₄- tetróxido de ósmio

OXPHOS- fosforilação oxidativa

PCr- fosfocreatina

PEO- *progressive external ophthalmoplegia*

pH- potencial hidrogeniônico

P_i- fosfato

PBS- *phosphate buffered saline*

pK_a- constante de dissociação ácida

PTP- poro de transição de permeabilidade

CoQ- coenzima Q

QH₂- ubiquinol

RNA- ácido ribonucleico

RRF- *ragged red fibers*

SDH- succinato desidrogenase

SPSS- *Statistical Package for the Social Science*

TRIS-HCl- *tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*

U- unidade enzimática

$\Delta\Psi$ - potencial de membrana mitocondrial

$\Delta\mu\text{H}^+$ - gradiente eletroquímico de prótons

-SH- grupamento tiol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fibras separadas em tampão BIOPS visualizadas em lupa.....	39
Figura 2. Cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina.....	48
Figura 3. Cortes histológicos corados pelo tricrômico de Gomori modificado.....	49
Figura 4. Cortes histológicos corados pela reação para a succinato desidrogenase.....	50
Figura 5. Cortes histológicos corados pela reação para a COX.....	51
Figura 6. Cortes histológicos corados pela <i>oil red O</i>	51
Figura 7. Achados histológicos do músculo esquelético de um paciente com IE e deleções múltiplas do mtDNA.....	52
Figura 8. Ultraestrutura de mitocôndrias em homogeneizados de biópsias congeladas previamente.....	58
Figura 9. Comparação de homogeneizado de amostra fresca e congelada do mesmo indivíduo.....	60
Figura 10. Consumo de O ₂ em homogeneizado de músculo esquelético congelado.....	61
Figura 11. Diferença no consumo de O ₂ de homogeneizados do grupo controle e DM.....	62
Figura 12. Avaliação do consumo de O ₂ da CTE do grupo IE, DM e controle.....	64
Figura 13. Avaliação do consumo de O ₂ da CTE de pacientes IE, pacientes DM e controles com idades semelhantes.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos de pacientes com doença mitocondrial, pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA e pacientes controles.....	44
Tabela 2. Achados à biópsia muscular esquelética de pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA.....	47
Tabela 3. Ensaio enzimático da CTE e citrato sintase.....	53
Tabela 4. Consumo de O_2 em fibras permeabilizadas de biópsias congeladas segundo o substrato adicionado.....	55
Tabela 5. Consumo de O_2 em homogeneizados de biópsias musculares congeladas segundo o substrato adicionado.....	56
Tabela 6. Comparação do consumo de O_2 da CTE do grupo controle e DM.....	62
Tabela 7. Comparação do consumo de O_2 da CTE do grupo controle, IE e DM.....	64
Tabela 8. Ensaio enzimático da CTE e citrato sintase dos grupos com idades semelhantes.....	65
Tabela 9. Comparação do consumo de O_2 da CTE do grupo controle, IE e DM com idades semelhantes.....	66
Tabela 10. Correlação entre o consumo de O_2 e ensaios enzimáticos dos complexos individuais da CTE e citrato sintase.....	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Introdução à intolerância ao exercício	19
1.2 Fisiologia do músculo estriado esquelético	20
1.3 Mitocôndria.....	21
1.4 As mutações no mtDNA e nDNA causam doenças mitocondriais	24
1.5 Intolerância ao exercício associada a deleções múltiplas no mtDNA	29
1.6 Métodos de avaliação da função mitocondrial.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3. HIPÓTESE.....	34
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	35
4.1 Casuística.....	35
4.1.1 Pacientes com doença mitocondrial (grupo DM).....	35
4.1.2 Pacientes com intolerância ao exercício (grupo IE).....	35
4.1.3 Pacientes controles (grupo controle).....	36
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Amostras de tecido muscular.....	37
4.2.1.1 Congelado.....	37
4.2.1.2 Fresco.....	37
4.2.2 Avaliação histopatológica do músculo esquelético.....	38
4.2.3 Preparo de fibras musculares permeabilizadas.....	38
4.2.4 Preparo do homogeneizado de músculo esquelético.....	39
4.2.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão do homogeneizado de músculo esquelético.....	39
4.2.5 Avaliação da cadeia transportadora de elétrons.....	40
4.2.5.1 Ensaio enzimáticos dos complexos da CTE.....	40
4.2.5.2 Consumo de O ₂ mitocondrial.....	41
4.2.5.2.1 Fibra muscular permeabilizada.....	41
4.2.5.2.2 Tecido muscular homogeneizado.....	41
4.2.6 Oxidação do NADH.....	42

4.7 Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Casuística.....	44
5.2 Avaliação histopatológica do músculo esquelético.....	46
5.3 Procedimento de homogeneização das amostras.....	52
5.4 Ensaio enzimático dos complexos da cadeia transportadora de elétrons.....	53
5.5 Estabelecimento do método de consumo de O ₂ dos complexos da CTE em homogeneizados de biópsias congeladas.....	54
5.5.1 Avaliação do consumo de O ₂ em fibras musculares permeabilizadas de biópsias congeladas.....	54
5.5.2 Avaliação do consumo de O ₂ em homogeneizados de biópsias congeladas segundo o substrato adicionado.....	55
5.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão dos homogeneizados.....	57
5.5.4 Avaliação da oxidação do NADH em homogeneizados de biópsias congeladas.....	59
5.5.5 Avaliação do consumo de O ₂ em homogeneizados de biópsias frescas e congeladas de controles utilizando o protocolo padrão.....	59
5.5.6 Análise do consumo de O ₂ em homogeneizados de controles e pacientes com DM.....	61
5.6 Estudo da cadeia transportadora de elétrons na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas no DNA mitocondrial.....	63
5.6.1 Avaliação dos complexos da CTE pelo consumo de O ₂	63
5.6.2 Avaliação da CTE dos grupos com idades semelhantes.....	64
5.6.3 Teste de correlação entre a atividade dos complexos da CTE e a atividade enzimática dos complexos da CTE e citrato sintase.....	66
6. DISCUSSÃO.....	68
7. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	85
APÊNDICES.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1 Introdução à intolerância ao exercício

Intolerância ao exercício (IE) é a incapacidade de desempenhar atividade física normalmente, com a ocorrência de sintomas como mialgia e fadiga relacionados à atividade física. Os sintomas se desenvolvem em resposta a atividades relativamente leves, o que os diferencia da fadiga fisiológica, podendo estar associados à rabdomiólise (FLAHERTY et al, 2001; FINSTERER & DRORY, 2016).

Embora consagrado na literatura especializada, o termo IE é inespecífico e não se refere apenas à intolerância ao exercício físico, como atividade sistematizada. Pode ocorrer com qualquer tipo de atividade física, incluindo as atividades corriqueiras de caminhar, mesmo dentro de casa, e realizar os cuidados pessoais, como tomar banho, escovar os dentes e pentear os cabelos. Portanto IE é um termo abrangente que não se relaciona a um único evento patológico, apresentando etiologias variadas (SOBREIRA et al., 2003; LAFORÊT & VIANEY-SABAN, 2010). De fato, o estabelecimento de um diagnóstico etiológico em situações clínicas em que a IE é o sintoma predominante é um desafio, mesmo nos dias atuais. Embora a IE possa ser observada em situações tão distintas como afecções hematológicas, endócrinas ou neurológicas, é também uma das formas de apresentação das miopatias metabólicas de origem genética, que constituem os erros inatos do metabolismo energético. Estes são causados por defeitos genéticos envolvendo as enzimas que participam nos eventos metabólicos de transformação de energia, conservando-a na forma de ATP (DIMAURO & ANDREU, 2001). Nos últimos anos, tem crescido o número de relatos de casos de doenças mitocondriais com IE como o único ou principal sintoma (GORMAN et al., 2015; LU et al., 2017). Com frequência, incapacita o indivíduo para a atividade física, contribuindo para o seu afastamento do trabalho e sua incapacitação definitiva para uma vida produtiva, comprometendo o convívio social e familiar (MANCUSO et al., 2012).

Para compreensão da fisiopatologia desse grupo de doenças, é importante o conhecimento do tecido muscular esquelético e da principal via metabólica responsável pela transformação energética.

1.2 Fisiologia do músculo estriado esquelético

As células musculares são altamente especializadas na conversão de energia química em energia mecânica. O tecido muscular estriado esquelético é constituído por células alongadas, contendo numerosos filamentos citoplasmáticos de proteínas contráteis, que geram forças necessárias para a contração deste tecido. Cada fibra muscular é composta por vários sarcômeros, que são um complexo proteico especializado para realizar a contração muscular. Cada sarcômero é composto principalmente por dois tipos de filamentos: filamento grosso, constituído predominantemente pela proteína miosina; e o filamento fino, composto por monômeros de actina, nebulina, tropomiosina e troponina. A zona em que um sarcômero se liga a outro é representado pela linha Z. De cada lado da linha Z encontra-se uma banda I, que contém filamentos os finos. Entre duas bandas I fica a banda A, onde ocorre uma sobreposição de filamentos finos com filamentos espessos de miosina. No centro da banda A está a linha M, que é circundada por uma faixa estreita, chamada banda H. Esta representa a porção de banda A que contém filamentos de miosina, mas não os de actina (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006).

A contração muscular ocorre pelo deslizamento dos filamentos de actina entre os de miosina para dentro do sarcômero, com consequente encurtamento da distância entre as duas linhas Z. No músculo em repouso, conhecido também como estado *OFF*, a tropomiosina encontra-se em íntimo contato com a actina, impedindo o contato da miosina com a actina. Uma família de proteínas de ligação à miosina, chamada proteína C de ligação à miosina, do inglês *Myosin Binding Protein-C*, atua na estabilidade da miosina nesse estado. Quando o músculo é estimulado, ocorre a liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) via retículo sarcoplasmático para o citoplasma. Estes Ca^{2+} agem sobre a troponina, promovendo uma deformação molecular, separando a tropomiosina da actina. Este movimento molecular expõe os grupamentos de actina que reagem com a miosina, estabelecendo-se assim pontes entre esses dois filamentos. Na etapa seguinte, ocorre hidrólise do ATP a ADP, com liberação de energia utilizada para dobrar a molécula de miosina. Consequentemente, os filamentos finos deslizam sobre os grossos promovendo a contração muscular com encurtamento dos sarcômeros (BERNE et al., 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006; McNAMARA & SADAYAPPAN, 2018).

A mitocôndria produz a maioria das moléculas de ATP para as reações químicas, não só as envolvidas na contração muscular, como também da fisiologia celular como um todo. Razão pela qual as doenças do metabolismo energético muscular são causas potenciais de intolerância ao exercício.

1.3 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas de células eucarióticas, que têm como uma de suas funções a síntese de ATP. Apesar de ser debatida, a hipótese simbiótica mitocondrial de Michael W. Gray ainda é amplamente aceita. Segundo ela, a mitocôndria teve origem em uma eubactéria ancestral que foi fagocitada por uma célula eucariota, sobreviveu aos mecanismos de defesa celular e estabeleceu uma relação simbiótica com a célula hospedeira. Neste processo, progressivamente os genes do genoma da eubactéria foram transferidos para o núcleo da célula eucariota, restando apenas poucos genes que compõem ainda hoje o DNA mitocondrial. Nesse processo evolutivo, a eubactéria tornou-se uma organela celular conversora de energia. Esta organela, agora chamada mitocôndria, exerce suas funções interagindo com o núcleo, com o citoplasma e até mesmo com as outras mitocôndrias (ZIMORSKI et al., 2014).

Sua estrutura é constituída por duas membranas que delimitam o espaço intermembranas, uma externa lisa e outra interna pregueada; esta última forma cristas que delimitam a matriz mitocondrial. Na matriz mitocondrial localiza-se o complexo da piruvato desidrogenase, as enzimas do ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos, algumas enzimas que realizam a oxidação dos aminoácidos, além de ribossomos, RNA, DNA e metabólitos. Na membrana interna ocorre a síntese do ATP necessário às funções celulares por meio da fosforilação oxidativa. Este fenômeno ocorre pela utilização da energia vinda dos carboidratos, gorduras e proteínas da dieta ou reservas. Cada substrato tem seu transportador específico na membrana interna para adentrar a matriz mitocondrial. Na matriz, estes substratos tem em comum a transformação em Acetil CoA, que é o combustível do ciclo de Krebs. O ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do ácido cítrico, tem como função produzir coenzimas reduzidas na forma de $\text{NADH} + \text{H}^+$ e FADH_2 . Estas coenzimas servirão de substratos para a cadeia respiratória, permitindo a

fosforilação do ADP em ATP de forma acoplada ao transporte de elétrons até o oxigênio molecular.

A cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons (CTE) é composta por moléculas que estão organizadas em complexos supramoleculares embebidos na membrana mitocondrial interna. São conhecidos quatro complexos transportadores de elétrons, cada um capaz de catalisar a transferência de elétrons de uma parte da cadeia para a outra, até a redução do oxigênio molecular:

O complexo I (CI), também chamado de NADH desidrogenase-coenzima Q oxidoredutase, é um complexo enzimático composto por 42 cadeias polipeptídicas ligadas a um mononucleotídeo de flavina (FMN) e pelo menos seis centros de ferro-enxofre (Fe-S). Catalisa simultaneamente dois processos acoplados: a transferência exergônica de um íon hidreto do NADH e um próton da matriz para a ubiquinona (coenzima Q), e a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranas. A rotenona inibe o CI pela ligação aos centros Fe-S.

O complexo II (CII), também chamado de succinato desidrogenase (SDH), é a única enzima do ciclo de Krebs que é ligada à membrana mitocondrial interna. Embora menor e mais simples que o complexo I, ele contém quatro subunidades proteicas diferentes, com cinco grupos prostéticos: três centros 2Fe-2S, um dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e um sítio de ligação para o substrato succinato. O malonato é um inibidor competitivo do CII.

O complexo III (CIII), também chamado de ubiquinol-citocromo *c* oxidoredutase, ou complexo dos citocromos *bc*₁, possui 22 subunidades diferentes, sendo o centro ativo constituído por três delas: o citocromo *b* com dois grupos prostéticos heme, uma proteína Fe-S de Rieske com um centro 2Fe-2S e o citocromo *c* com um grupo prostético heme. O CIII acopla a transferência de elétrons do ubiquinol (QH₂), que retirou elétrons do complexo I ou II, para o citocromo *c*. Concomitante a esta etapa, ocorre o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas. A antimicina A inibe o CIII pela ligação aos citocromos *bc*₁.

O complexo IV (CIV), também chamado de citocromo *c* oxidase (COX), é uma proteína de 13 subunidades. O centro ativo é composto por três subunidades: a primeira com dois grupos heme e um íon cobre formando o centro de ferro-cobre (Fe-Cu) binuclear, a segunda com dois íons cobre e a terceira possuindo sete hélices transmembranas. A COX transporta dois elétrons do citocromo *c* para o

oxigênio molecular, reduzindo-o a H_2O . Nesta etapa também ocorre o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas. O KCN e a azida inibem o CIV.

A ATP sintase (CV) é uma ATPase do tipo F, ou seja, é uma bomba de prótons reversível, impulsionada por ATP. Possui um domínio periférico de ligação ao ADP e ATP(F_1), que é constituído por três subunidades α , três subunidades β , uma unidade δ , um eixo central (subunidades γ , δ e ϵ) e subunidades *OSCP*, F_6 , *d* e *b*. A parte integral (F_0) é responsável pelo bombeamento de prótons e tem múltiplas cópias da subunidade *c*, uma subunidade *a*, uma subunidade *f*, uma subunidade *g*, uma subunidade *e*, uma subunidade *ATP6*, uma subunidade *ATP8* e duas subunidades *b*. A oligomicina é um inibidor do CV (DIMAURO & SCHON, 2003; NELSON & COX, 2011; KADENBACH & HÜTTEMANN, 2015; HE et al., 2018).

Schägger e Pfeiffer (2000) demonstraram que os complexos da CTE não estão presentes apenas de forma isolada, ocorrendo também na forma dos chamados supercomplexos. Os supercomplexos são a combinação de mais de uma unidade dos complexos da cadeia respiratória, como a associação dos complexos I, III e IV. Essas combinações refletem a demanda energética celular de cada ser vivo, podendo ocorrer várias combinações a fim de otimizar o transporte de elétrons até o oxigênio molecular. Com avanços na tecnologia da espectrometria de massas de interligação, foi possível observar que os complexos da CTE, incluindo o CV, existem em estreita proximidade espacial, fornecendo uma evidência para a montagem dos supercomplexos. Além da combinação clássica de CI-CIII-CIV, o supercomplexo pode se organizar com todos complexos agrupados (CI-CII-CIII-CIV-CV) além das proteínas chaperonas de montagem (LIU et al., 2018).

Segundo Mitchell (1961), a passagem de elétrons através dos complexos da CTE permite um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente eletroquímico. A formação deste potencial eletroquímico transmembrana seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação do ADP. O componente elétrico ($\Delta\Psi$) deste potencial atinge valores de aproximadamente 180 mV, no estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de H^+ através da ATP sintase de volta ao interior da matriz mitocondrial, desta vez a favor do gradiente, está diretamente acoplado à fosforilação do ADP a ATP.

As proteínas sintetizadas no interior da mitocôndria são codificadas na própria organela, que é provida de material genômico próprio, o DNA mitocondrial

(mtDNA). Embora a síntese proteica ocorra também na mitocôndria, a maior parte do arsenal metabólico mitocondrial é codificada no núcleo, sintetizada no citoplasma e transportada ao compartimento mitocondrial apropriado (ATTARDI & SCHATZ, 1988). Cada mitocôndria contém de duas a dez cópias de DNA circular de fita dupla, composto, na espécie humana, por 16.569 pares de bases. Os 37 genes ali presentes codificam 13 RNAs mensageiros (mRNA), 22 RNAs transportadores (tRNA) e 2 RNAs ribossômicos (rRNA). Das 89 subunidades de proteínas que compõem o sistema da fosforilação oxidativa, apenas 13 são codificadas pelo mtDNA. Os polipeptídeos codificados pelos mRNAs correspondem às seguintes subunidades das proteínas da CTE: subunidades 1, 2, 3, 4, 4L, 5 e 6 do CI; o citocromo *b*, do CIII; e as subunidades I, II e III da COX. As subunidades ATP6 e ATP8 da ATP sintase são também codificados pelo mtDNA (ANDERSON et al., 1981; ZEVIANI et al., 1989).

Portanto, dois sistemas genéticos distintos codificam proteínas mitocondriais: o mtDNA, que codifica 13 polipeptídeos do sistema de fosforilação oxidativa e 24 ácidos nucleicos (2 rRNAs e 22 tRNAs), e o DNA nuclear (nDNA), que codifica a maioria dos polipeptídeos do sistema de fosforilação oxidativa e os demais polipeptídeos presentes na organela. Desta forma, alterações envolvendo o nDNA ou o mtDNA podem comprometer o sistema de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, ocasionando falha na produção de ATP, por fim resultando num grupo de doenças denominadas mitocondriopatias.

1.4 As mutações no mtDNA e nDNA causam doenças mitocondriais

As doenças mitocondriais (DM), também conhecidas como mitocondriopatias, são um grupo de desordens clinicamente heterogêneas decorrentes de disfunção mitocondrial. O termo mitocondriopatia é aplicado predominantemente às condições primárias, entretanto podem representar um processo secundário associado, por exemplo, ao uso de medicamentos como os antirretrovirais. As mitocondriopatias causadas por defeito na fosforilação oxidativa, de origem genética, ocorrem por mutações no nDNA e/ou mtDNA que codificam proteínas envolvidas na função mitocondrial. São também o grupo mais comum das desordens metabólicas hereditárias, estando entre as formas mais comuns de doenças neurológicas hereditárias. Os sintomas podem surgir em qualquer faixa etária, desde a infância

até a idade adulta, e podem afetar um órgão isolado ou ser multissistêmicos. Um dos desafios das DM é a elevada variação clínica observada nos pacientes, o que pode dificultar o diagnóstico. Inclusive, há uma falta de correlação genótipo-fenótipo em muitos distúrbios mitocondriais, o que significa que estabelecer um diagnóstico genético pode ser um processo complexo, e permanece indefinido para muitos pacientes (GORMAN et al., 2016).

A prevalência das DM tem se mostrado difícil de estabelecer, predominantemente como resultado da heterogeneidade genética e clínica. O espectro fenotípico das doenças mitocondriais se expandiu significativamente desde os relatos originais, que associaram as síndromes clínicas clássicas com mutações representadas por rearranjos do mtDNA ou mutações pontuais. A revolução nas tecnologias genéticas permitiu avaliar amplamente o genoma nuclear, melhorando o diagnóstico das doenças mitocondriais. A taxa de prevalência mínima para mutações no mtDNA na população do Nordeste da Inglaterra é de 1 caso em 5.000 adultos, ou seja, cerca de 20 casos a cada 100.000 pessoas que estão na faixa etária adulta, sendo em torno de 5 casos / 100.000 crianças. Dentre os estudos populacionais atuais, há uma prevalência que varia de 2,8 a 21 / 100.000 casos de DM distribuídos nos países Suécia, Portugal, Espanha, Irlanda, Inglaterra, Austrália e Japão (DARIN et al., 2001; SKLADAL et al., 2003; GORMAN et al., 2015; GORMAN et al., 2016; ALSTON et al., 2016).

A herança materna do mtDNA não permite a aplicação das leis mendelianas de herança, em contraste à do nDNA. Além disso, cada mitocôndria possui várias cópias do mtDNA, permitindo o fenômeno da heteroplasmia, que é a coexistência de uma mistura de moléculas mutantes e de moléculas do tipo selvagem. Ao contrário, a homoplasmia ocorre quando todas as moléculas de mtDNA têm o mesmo genótipo. No geral, a porcentagem de mtDNA mutante deve ser elevada para que ocorra uma manifestação clínica, indicando que mesmo em quantidades mais baixas de mtDNA selvagem, a mitocôndria mantém suas funções adequadamente. Quando a carga de mutação excede o limiar de tolerância, que é diferente em cada tecido, e para mutações distintas ocorrem disfunções metabólicas e sintomas clínicos associados aos órgãos acometidos (ALSTON et al., 2017).

Já foi relatado em cada gene do mtDNA ao menos uma mutação, sendo associadas a sintomas clínicos variáveis. Como enfatizado anteriormente, podem ocorrer desde quadros monossintomáticos, como a surdez neurossensorial não

sindrômica, até quadros multissistêmicos, como a encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (AVC) (MELAS), do inglês *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes* (ALSTON et al., 2017). As mutações do mtDNA podem afetar um único nucleotídeo, sendo chamadas de mutações de ponto, abranger um pequeno número de pares de bases (pequenas deleções ou inserções) ou resultar em grandes rearranjos no mtDNA, nos quais se observam mais frequentemente a perda de um grande número de nucleotídeos, envolvendo simultaneamente vários genes do mtDNA. As mutações pontuais e deleções de grande escala no mtDNA representam as duas causas mais comuns de doença primária do mtDNA, a primeira sendo geralmente herdada da mãe, e a última tipicamente surgindo durante o desenvolvimento embrionário (MENG et al., 2018).

As mutações de ponto em genes do mtDNA que codificam tRNAs e rRNAs causam, por exemplo, fenótipos associados à surdez induzida por aminoglicosídeos e não sindrômica, como no caso da m.1555A>G no gene *MT-RNR1* que codifica o rRNA 12S (MENG et al., 2018). A mutação m.3243A>G no gene *MT-TL1* que codifica o tRNA^{Leu} é a principal causa da síndrome MELAS, um distúrbio multissistêmico com início tipicamente na infância, acometendo não apenas o sistema nervoso através de encefalopatia com episódios semelhantes a AVC, epilepsia e cefaleia, mas também outros órgãos como o coração e os do sistema endócrino. O início dos sintomas ocorre frequentemente entre as idades de dois e dez anos. O indivíduo acometido por esta síndrome tem um desenvolvimento neuropsicomotor geralmente normal, porém a baixa estatura é comum. Os sintomas iniciais mais comuns são crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas, cefaleia, anorexia e vômitos recorrentes. Intolerância ao exercício ou fraqueza proximal pode ser as manifestações iniciais. As crises epiléticas são frequentemente associadas a episódios de hemiparesia transitória ou cegueira cortical, sendo a perda auditiva neurosensorial comum. Os episódios semelhantes ao AVC podem ser acompanhados por alteração da consciência e são frequentemente recorrentes. Os efeitos residuais cumulativos dos episódios semelhantes ao AVC gradualmente prejudicam as habilidades motoras, a visão e as funções cognitivas, geralmente com impacto na funcionalidade já na adolescência ou na idade adulta jovem (DIMAURO & HIRANO, 2013).

As deleções únicas no mtDNA, que constituem rearranjos de larga escala, têm uma frequência populacional na Inglaterra de 1,5 / 100.000 adultos, sendo a principal causa de oftalmoplegia externa progressiva crônica (PEO ou CPEO), cujos fenótipos variam desde uma miopatia pura com oftalmoplegia até um quadro multissistêmico como a síndrome de Kearns-Sayre (KSS) (aproximadamente 30% dos casos); mais raramente pode resultar na síndrome de Pearson (menos de 5% dos casos). A síndrome de Pearson é a apresentação mais grave associada a grandes deleções únicas no mtDNA. Os pacientes apresentam precocemente na vida anemia sideroblástica e disfunção pancreática, e a condição é frequentemente fatal na infância. Os pacientes com KSS apresentam antes dos 20 anos, ptose palpebral e/ou PEO com retinopatia pigmentar e pelo menos dois sinais de envolvimento multissistêmico como ataxia, bloqueio de condução cardíaca, hiperproteíno-rraquia, surdez e *Diabetes mellitus*, dentre outras manifestações. A PEO isolada é uma das apresentações mais benignas atribuível a deleções no mtDNA, sendo uma miopatia que se manifesta com oftalmoplegia e ptose palpebral, podendo ocorrer fraqueza muscular nos membros. Ao contrário dos rearranjos gênicos nucleares, as grandes deleções únicas no mtDNA frequentemente surgem esporadicamente durante o desenvolvimento embrionário, tendo um baixo risco de recorrência. Mulheres afetadas clinicamente que possuem mtDNA com deleção única de grande escala têm baixo (menos de 10%) risco de transmissão (GORMAN et al., 2015; ALSTON et al., 2017).

O nDNA codifica genes da fosforilação oxidativa e também todas as proteínas responsáveis pela manutenção do mtDNA, especialmente aquelas envolvidas na replicação, bem como outras proteínas necessárias para a transcrição e controle do número de cópias deste genoma. Mutações nesses genes podem causar instabilidade secundária do genoma mitocondrial na forma de depleção (número reduzido de moléculas de mtDNA na célula), deleções múltiplas ou acúmulo de mutações pontuais que, por sua vez, levam a doenças mitocondriais herdadas de maneira mendeliana. A lista dos genes envolvidos na replicação, transcrição e manutenção do mtDNA é longa e ainda incompleta. Dentre os produtos da expressão de genes nucleares relacionados com a replicação e a manutenção do mtDNA estão a subunidade catalítica da DNA polimerase gama (codificado pelo gene *POLG1*) e seu fator de processividade (codificado pelo gene *POLG2*), a helicase *Twinkle* (codificada pelo gene *TWNK*, também conhecido como *PEO1*), a

helicase de replicação do DNA/ nuclease 2 (codificada pelo gene *DNA2*), a proteína de ligação única do DNA 1 (codificada pelo gene *SSBP1*), a primase e polimerase (codificada pelo gene *PRIMPOL*) e exonuclease de manutenção do genoma mitocondrial 1 (codificada pelo gene *MGME1*). Os genes relacionados à transcrição e controle do número de cópias do mtDNA codificam a RNA polimerase mitocondrial (gene *POLRMT*), o fator de transcrição mitocondrial A (gene *TFAM*) e o fator de alongamento de transcrição mitocondrial (gene *TEFM*). Apresentam grande relevância nesse contexto os genes relacionados à manutenção do conjunto de nucleotídeos e os que codificam proteínas que participam das vias de síntese e recuperação dos nucleotídeos: os genes das vias de síntese, os genes da recuperação de nucleotídeos e o do translocador de nucleotídeos (gene *ANT1*) (GORMAN et al., 2016; RUSECKA et al., 2018).

O diagnóstico das DM é muitas vezes estabelecido pela presença de achados laboratoriais que indicam a existência de disfunção mitocondrial. O sinal morfológico mais característico é a presença de fibras vermelhas rasgadas (RRF). As RRF representam um acúmulo subsarcolemal de mitocôndrias, que geralmente são anormais, sendo demonstradas à coloração do tricrômico de Gomori modificado e à reação histoenzimológica para a atividade da SDH em biópsias musculares. Outro achado típico é a presença de fibras musculares que não se coram pela reação histoquímica para a COX, ou seja, fibras COX negativas (ZEVIANI & DIDONATO, 2004). Ensaio enzimáticos com a mensuração da atividade das enzimas da CTE em homogeneizados de tecidos e células também são utilizados na investigação diagnóstica. Embora os achados morfológicos e bioquímicos ajudem a caracterizar a existência de disfunção mitocondrial, eles podem estar ausentes em algumas DM (VLADUTIU & HEFFNER, 2000). A ausência de anormalidades, no entanto, não descarta o diagnóstico de DM, tornando complexo o processo de investigação etiológica, em especial dos quadros clínicos inespecíficos.

Nesse contexto inclui-se a intolerância ao exercício, que embora represente queixa inespecífica, é reconhecida como uma importante manifestação clínica nas doenças da CTE, principalmente nos defeitos nos complexos I, III e IV, manifestando também na deficiência de coenzima Q10 (SOBREIRA et al., 1997; DIMAURO & SCHON, 2003; QUINZII et al., 2007). A IE é relatada tanto como a consequência de mutações primárias do mtDNA, como também a consequência por mutações do

nDNA, podendo ser a única manifestação ou fazer parte de quadros multissistêmicos (KEIGHTLEY et al., 2000; MANCUSO et al., 2012).

1.5 Intolerância ao exercício associada a deleções múltiplas no mtDNA

As deleções múltiplas no mtDNA em pacientes com IE foram relatadas pela primeira vez em 1991 por Ohno et al. Porém, o conhecimento a respeito da ocorrência de deleções múltiplas no mtDNA como causa de IE pouco evoluiu a partir de então. Até que, um estudo prévio de nosso grupo de trabalho identificou um subgrupo de 30 pacientes com IE de etiologia não determinada, nos quais foram observadas deleções múltiplas no mtDNA. A maioria dos pacientes apresentava a intolerância ao exercício iniciada após 10 a 30 minutos de atividade física moderada e referiu melhora parcial dos sintomas após alguns minutos de repouso. Dois pacientes referiram a ocorrência de câimbras relacionadas aos esforços. Cinco pacientes apresentavam padrão de herança autossômico dominante e três autossômico recessivo. Os achados laboratoriais indicaram um aumento do lactato sérico após o exercício em quase todos os pacientes, inclusive um dos pacientes apresentou lactato de 11,5 mmol/L, que representa uma elevação relevante. Biópsias musculares esqueléticas de 19 pacientes apresentaram sinais de disfunção da cadeia respiratória (CARVALHO, 2012). O padrão de herança mendeliana observado nesses pacientes reforça a hipótese de que as deleções múltiplas no mtDNA estejam relacionadas com o quadro clínico, podendo ser decorrentes de mutações primárias no nDNA, conforme demonstrado em outras casuísticas de pacientes com PEO e deleções múltiplas do mtDNA (CARROZZO et al., 1998).

O envolvimento do nDNA em disfunção da cadeia respiratória mitocondrial decorrente de defeitos da manutenção do mtDNA veio com o estudo de Zeviani et al. (1989). Nesse estudo foram identificadas deleções múltiplas em famílias com padrão de herança mendeliana, levantando a hipótese de mutações em genes nucleares resultando em instabilidade do mtDNA. Suomalainen et al. (1995), que analisou uma família finlandesa com oftalmoparesia externa progressiva (PEO) de herança autossômica dominante (adPEO), determinou através de estudos de ligação a localização provável do gene responsável pela doença no braço longo do cromossomo 10. O conhecimento atual sobre mutações em genes nucleares que implicam em deleções múltiplas no mtDNA relaciona essas mutações a vários

distúrbios e síndromes neurológicas (RUSECKA et al., 2018). Embora a causa do aparecimento de deleções múltiplas do mtDNA no paciente descrito por Ohno et al. (1991) e no nosso grupo de pacientes com IE ainda não esteja definida, é possível que também se relacione aos genes nucleares responsáveis pela manutenção do mtDNA.

1.6 Métodos de avaliação da função mitocondrial

A maneira ideal de investigar a função mitocondrial em um paciente com suspeita de DM é obter uma biópsia fresca de um tecido afetado, como o músculo esquelético, fígado, músculo cardíaco, rim e assim por diante (THORBURN & SMEITINK, 2001 apud KIRBY et al., 2007). Por ser mais acessível e frequentemente envolvido, o músculo estriado esquelético é o principal tecido obtido para tais análises. O estudo da função mitocondrial do paciente é feito por meio de metodologias experimentais envolvendo diversos tipos de materiais biológicos, as quais estão sujeitas a erros sistemáticos, associados aos métodos de processamento das amostras a analisar.

A metodologia experimental mais relevante para avaliar a função mitocondrial ainda é intensamente debatida na literatura, incluindo o modelo experimental mais adequado a ser utilizado. Dentre eles estão: fibras musculares permeabilizadas (VEKSLER et al., 1987), cultura celular (ROBINSON et al., 1985), mitocôndrias isoladas (CHANCE & WILLIAMS, 1956) e homogeneizado de tecido (DIMAURO et al., 1987). Cada modelo possui particularidades em seus métodos, que devem ser levadas em consideração de acordo com os objetivos traçados e o material disponível.

A fibra permeabilizada preserva aproximadamente 95% das mitocôndrias com morfologia intacta. Mas foi relatada maior variação interpessoal no empreendimento da técnica, quando comparado com a técnica de homogeneização (LARSEN et al., 2012; TOKONOGI et al., 1998). O tempo de preparo das fibras é de 1 a 2 horas (KUZNETSOV et al. 2008), sendo um fator limitante na quantidade de amostra a ser analisada.

A cultura celular de fibroblastos e mioblastos é uma técnica empregada desde a década de 80 na investigação de DM, inclusive com relato de um paciente com IE e deficiência parcial da COX, encontrada tanto no tecido muscular como nos

fibroblastos cultivados (MIYABAYASHI et al., 1983 apud ROBINSON et al., 1985). A cultura celular pode ser utilizada na investigação de biomoléculas de potencial terapêutico, através de ensaios enzimáticos da CTE ou mais amplamente da fosforilação oxidativa, ensaio de potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), crescimento celular e conteúdo mitocondrial (SOIFERMAN et al., 2014). Infelizmente, Thorburn e cols (2004) e outros grupos de pesquisa citados por ele, constataram que cerca de metade dos pacientes com defeito enzimático da CTE no músculo esquelético apresentaram atividade enzimática normal na cultura de fibroblastos.

A técnica de isolamento mitocondrial foi uma das primeiras a ser empregada, sendo utilizada até os dias de hoje para o estudo da função mitocondrial e investigação de biomoléculas. Contudo, o rendimento da amostra é de 20 a 40% (RASMUSSEN et al., 2003), exigindo grandes quantidades de tecido para realizar os testes funcionais. Além disso, esta técnica modifica a morfologia da organela, podendo aumentar a produção de EROs e sensibilizar o poro de transição de permeabilidade (PTP) induzido por Ca^{2+} , quando comparado com as técnicas de cultivo celular e fibra permeabilizada (PICARD et al., 2011).

A técnica de preparo do homogeneizado de músculo esquelético é usada no estudo da função mitocondrial desde a década de 80, sendo a mais rápida no preparo da amostra. Existem vários protocolos de avaliação da função mitocondrial neste modelo, principalmente no estudo enzimático da CTE (GELLERICH et al., 2004). Ao comparar a respiração mitocondrial em homogeneizado *versus* fibras permeabilizadas, a capacidade de síntese de ATP e a integridade da membrana mitocondrial parecem ser prejudicadas pelo procedimento de homogeneização. Porém, não há diferença na resposta ao adicionar os substratos (LARSEN et al., 2014). Isso indica que o comprometimento só é observado quando o consumo de O_2 está acoplado à fosforilação do ADP. Essas observações tornam as duas técnicas equivalentes, quando analisada apenas a atividade da CTE. Inclusive, um estudo recente confirmou que fibras musculares frescas homogeneizadas podem ser utilizadas para medir atividade da CTE por respirometria, mostrando sensibilidade a inibidores do CI ao CIV (VIENNE et al., 2017).

Existe um debate na literatura se o procedimento de congelamento é adequado quando pretende-se avaliar a função mitocondrial. O grupo de Thorburn e colaboradores (2004) observou que as biópsias congeladas podem permanecer

estáveis por mais de 10 anos, se as amostras tiverem sido congeladas rapidamente e armazenadas pelo menos a -70°C . A atividade enzimática dos complexos da CTE (analisando cada complexo individualmente) e da citrato sintase está preservada nas amostras congeladas (KIRBY et al., 2007), podendo ser mensuradas na avaliação da função mitocondrial. Contudo, o uso de tecidos homogeneizados de biópsias congeladas possui limitações. Ao comparar com os homogeneizados de biópsias frescas, a taxa de produção de ATP e fosfocreatina a partir da oxidação de piruvato e malato é praticamente anulada (JANSSEN et al., 2003). O estudo de Larsen e colaboradores (2012) confirmou que o congelamento prejudica a OXPHOS em mitocôndrias de fibras permeabilizadas, inviabilizando este parâmetro no estudo da função mitocondrial.

O procedimento de congelamento de amostras de biópsias é comum na prática clínica como forma de armazenamento. Embora possa diminuir a qualidade da amostra, é necessário em pesquisas clínicas por muitas razões: nem todos os procedimentos a serem realizados estão definidos no momento da coleta, pois dependem dos achados no processamento de rotina; laboratórios capacitados para essa análise especializada são raros, sendo frequente a necessidade de recebimento de amostras coletadas em outras localidades; torna-se mais prático processar grande quantidade de amostras; e transporte do laboratório de armazenamento para o laboratório do processo de exame. Isso evidencia a importância da pesquisa de métodos diagnósticos confiáveis utilizando amostras criopreservadas.

A utilização de amostras criopreservadas é essencial para o desenvolvimento deste projeto, uma vez que a determinação da existência de deleções múltiplas do mtDNA no músculo esquelético ocorre tempos depois da coleta da biópsia muscular. Ademais, utilização de material fresco para investigação da função mitocondrial implicaria na realização de nova biópsia muscular.

Como as deleções múltiplas no mtDNA são alterações secundárias, é essencial demonstrar que as mesmas estão repercutindo negativamente na função mitocondrial nesse grupo de pacientes. A IE é um problema de saúde que leva à incapacidade física em uma parcela da população que se situa predominantemente na faixa adulta em fase produtiva. Além de contribuir para o diagnóstico e a compreensão da fisiopatologia da IE, os resultados terão um importante papel em uma futura abordagem terapêutica para os indivíduos acometidos por esta doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a repercussão das deleções múltiplas no mtDNA no funcionamento da CTE em pacientes com intolerância ao exercício.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo para avaliação da CTE através do consumo de O_2 a partir de biópsias de músculo esquelético congeladas;
- Avaliar se as deleções múltiplas no mtDNA resultam em comprometimento da função da CTE no músculo esquelético.

3. HIPÓTESE

A manifestação clínica de IE é reconhecidamente associada a disfunções do metabolismo energético do tecido muscular, sendo associada também a doenças da CTE. No fenômeno da heteroplasmia, os mtDNAs mutantes coexistem com os mtDNAs selvagens (normais), influenciando proporcionalmente na manifestação clínica. Como deleções múltiplas no mtDNA são alterações secundárias, não é sabido se a manifestação clínica dos pacientes com IE e deleções múltiplas está relacionada à presença das mesmas. Devido à importância do mtDNA no funcionamento adequado das mitocôndrias, nossa hipótese é a de que as deleções múltiplas no mtDNA observadas nesses pacientes resultam em comprometimento do metabolismo energético mitocondrial. Entretanto, o grau de comprometimento esperado deve ser menor que o decorrente de mutações responsáveis por quadros clínicos mais graves.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

A casuística foi obtida no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP).

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP-USP, Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da FMRP-USP e Laboratório de Estudo do Metabolismo Mitocondrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

O projeto de pesquisa intitulado “Função mitocondrial na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas do DNA mitocondrial”, juntamente com os termos de consentimento livre e esclarecido, foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP, sendo aprovados em sua 446^a Reunião Ordinária, de acordo com o processo 15334/2016 (ANEXO A).

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Pacientes com doença mitocondrial (Grupo DM)

O grupo DM foi constituído por quatro pacientes, sendo dois pacientes com MELAS decorrente da mutação m.3243A>G no gene do tRNA^{Leu} (*MT-TL1*) e dois pacientes com PEO decorrente de deleção única do mtDNA, em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Neuromusculares do HC-FMRP-USP (ANEM). Os mesmos foram submetidos à biópsia muscular no processo de rotina de investigação diagnóstica. Esses pacientes foram selecionados por conveniência, considerando-se a quantidade de fragmentos de biópsia de músculo esquelético armazenados.

4.1.2 Pacientes com intolerância ao exercício (Grupo IE)

Dos 50 pacientes com intolerância ao exercício e deleções múltiplas do mtDNA em acompanhamento no ANEM, 13 foram incluídos no estudo pela disponibilidade de fragmentos de biópsia de músculo esquelético armazenados. Os

mesmos foram submetidos à biópsia muscular no processo de rotina de investigação diagnóstica.

Foram utilizados como critérios de inclusão:

- 1- ter intolerância ao exercício como sintoma predominante, caracterizada por fadiga muscular e/ou mialgia, ambas desencadeadas por atividade física, sendo estes sintomas considerados anormais, ou desproporcionais à atividade, pelo paciente;
- 2- ter sido submetido à biópsia muscular para investigação diagnóstica em decorrência dessas queixas, sendo constatada a presença de deleções múltiplas do mtDNA pelo método de PCR.

Foram utilizados como critérios de não inclusão:

- 1- presença de infiltrado inflamatório à biópsia muscular, coletada no processo de rotina de investigação diagnóstica;
- 2- uso de medicamento que comprometa a função mitocondrial, especialmente anti-retrovirais e estatinas à época da realização da biópsia muscular ou nos 12 meses antecedentes.

4.1.3 Pacientes controles (Grupo controle)

O grupo controle foi constituído por sete pacientes do ANEM do HC-FMRP-USP submetidos à biópsia muscular no decorrer do processo de rotina de investigação de suas doenças.

Foram utilizados como critérios de inclusão:

- 1- não apresentar doença muscular degenerativa, disfunção mitocondrial ou queixa de intolerância ao exercício;
- 2- apresentar idade semelhante aos pacientes do grupo de intolerância ao exercício e deleções múltiplas do mtDNA.

Foram utilizados como critérios de não inclusão:

- 1- presença de infiltrado inflamatório à biópsia muscular, coletada no processo de rotina de investigação diagnóstica;
- 2- uso de medicamento que comprometa a função mitocondrial, especialmente anti-retrovirais e estatinas à época da realização da biópsia muscular ou nos 12 meses antecedentes.

Os seguintes dados clínicos foram obtidos do prontuário médico arquivado no HC-FMRP-USP: idade no momento da biópsia, idade de início dos sintomas, gênero, história familiar de casos semelhantes, síndrome clínica e exames laboratoriais.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Amostras de tecido muscular

4.2.1.1 Congelado

No serviço de doenças neuromusculares do HC-FMRP-USP, as amostras de tecido muscular estriado esquelético de adultos são obtidas por biópsia aberta dos músculos bíceps braquial, ou outro, de acordo com a indicação clínica, sob anestesia local, sendo aplicada anestesia geral quando necessário. Um fragmento é imediatamente congelado em isopentano, cujo recipiente está banhado por nitrogênio líquido, e armazenado em nitrogênio líquido para posterior análise. Para o presente estudo, não foi necessária a ampliação da biópsia muscular, sendo suficiente o material colhido durante o procedimento de rotina realizado para a investigação diagnóstica.

4.2.1.2 Fresco

As amostras de tecido muscular estriado esquelético de três pacientes selecionados para o grupo controle foram obtidas durante o procedimento de rotina de investigação diagnóstica no ANEM. Os pacientes foram consultados antes da realização da biópsia, quanto à permissão para que parte do fragmento coletado fosse utilizada a fresco, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido. Subsequentemente, esse fragmento foi separado e imerso no tampão BIOPS, cuja composição é 10 mM de Ca-EGTA, 0,1 μ M de CaCl_2 , 20 mM de imidazol, 20 mM de taurina, 50 mM de KMES, 0,5 mM de DTT, 6,56 mM de MgCl_2 , 0,577 mM de ATP, 15 mM de fosfocreatina e pH 7,1, em banho de gelo. Imediatamente após este procedimento, as amostras foram processadas e analisadas.

4.2.2 Avaliação histopatológica do músculo esquelético

As colorações realizadas de rotina em cortes histológicos de tecido muscular são: hematoxilina e eosina, tricrômico de Gomori modificado (TGM), *oil red O* e ácido periódico de Schiff, reações histoenzimológicas para NADH-TR, SDH, COX, fosfatase ácida lisossomal e ATPases com pré-incubações nos pHs 9,4, 4,6 e 4,3.

Processamento histoquímico para análise das atividades das enzimas SDH e COX foi realizado como descrito por Bonilla et al. (1992). As fibras foram avaliadas quanto à intensidade da coloração da SDH, que identifica fibras com proliferação anormal das mitocôndrias (fibras *ragged red* [RRFs] apresentam coloração azul de maior intensidade, especialmente nas porções subsarcolemais); quanto à intensidade da reação da COX para a identificação das fibras COX- (COX negativas), assim como das RRFs COX+ (COX positivas).

Foram reavaliados para o presente estudo as seguintes características:

- atrofia de fibras, por análise subjetiva comparando a área transversal das várias fibras do mesmo fragmento;
- internalização nuclear, por quantificação aproximada da porcentagem de fibras com esta alteração;
- acúmulo de lipídeo, por quantificação subjetiva da coloração de *oil red O*;
- acúmulo de glicogênio, por quantificação subjetiva da coloração de ácido periódico de Schiff;
- desorganização interna da fibra, observada à reação da NADH-TR;
- aumento subsarcolemal de mitocôndrias, pelo acúmulo de material vermelho na coloração TGM e pela intensidade das reações para a SDH e COX;
- fibras COX negativas, pela ausência de coloração à reação para a COX;
- marcação lisossomal, pela reação para a fosfatase ácida lisossomal;
- ATPase, observando o padrão de envolvimento dos diferentes tipos de fibras musculares (1, 2A e 2B).

4.2.3 Preparo de fibras musculares permeabilizadas

Para o preparo das fibras musculares permeabilizadas, um fragmento de músculo esquelético foi pesado e imerso em tampão BIOPS. As fibras musculares foram separadas sob a visualização em lupa da marca Olympus, modelo SZ40

(figura 1). Foram utilizadas 1 a 4 mg de fibras, transferidas a um recipiente contendo tampão BIOPS acrescido de saponina 50 $\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos. As amostras foram mantidas em banho de gelo durante todo o procedimento.

Figura 1. Fibras separadas em tampão BIOPS visualizadas em lupa com aumento de 40x.

4.2.4 Preparo do homogeneizado de músculo esquelético

Para obtenção do homogeneizado na concentração de 10% (peso/volume), um fragmento de músculo esquelético foi pesado, sendo posteriormente adicionadas 9 partes do tampão BIOPS, ou do tampão CPT, que contém 50 mM de TRIS-HCl e 150 mM de KCl no pH 7,5; homogeneizado em equipamento homogeneizador da marca PowerGen 125 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) a 30.000 rotações por minuto por até 5 segundos. As amostras foram mantidas em banho de gelo durante todo o procedimento.

4.2.4.1 Microscopia eletrônica de transmissão do homogeneizado de músculo esquelético

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada em homogeneizados de biópsias musculares previamente coletadas, e congeladas em

nitrogênio líquido. O homogeneizado foi centrifugado à 800Xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e centrifugado a 9.000Xg por 20 minutos a 4°C. O *pellet* resultante foi fixado com 2% de glutaraldeído, 2% de formaldeído, 0,5% de CaCl_2 em PBS com Ca^{+2} e Mg^{+2} por 2 horas a 4°C. Em seguida, o *pellet* foi lavado com 0,1 M do tampão cacodilato (pH 7,4) por 1 hora a 4°C. Os componentes fixados foram pós-fixados com 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) por 2 horas a 4°C, lavados com água destilada, desidratados em graduadas séries de etanol (de 30% a 100%), infiltrados em óxido de propileno, embebidas na resina Embed 812 e polimerizadas por 72 horas a 60°C. Posteriormente, o material foi fatiado em finas secções, sendo estas impregnadas com acetato de uranila e citrato de chumbo por 10 minutos e examinadas no microscópio eletrônico (Jeol JEM- 100 CXII). As imagens foram processadas e analisadas utilizando o *software* NIH-developed Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD; disponível em <https://imagej.net>). Para fins de visualização, o contraste foi modificado usando o plugin CLAHE (Stephan Saalfeld, 2010; disponível em [https://imagej.net/Enhance_Local_Contrast_\(CLAHE\)](https://imagej.net/Enhance_Local_Contrast_(CLAHE))), mantendo as proporções equivalentes para todas as imagens.

4.2.5 Avaliação da cadeia transportadora de elétrons

Avaliação da CTE foi realizada através da atividade dos complexos enzimáticos e da quantificação do consumo de O_2 .

4.2.5.1 Ensaios enzimáticos dos complexos da CTE

Os ensaios enzimáticos para mensuração da atividade dos complexos da CTE e da citrato sintase foram realizados em homogeneizados de músculo esquelético em tampão BIOPS. Atividades das enzimas NADH- ubiquinona redutase (CI), SDH (CII), succinato-citocromo *c* redutase (complexos II+III), ubiquinol-citocromo *c* oxidoreductase (CIII), COX (CIV) e citrato sintase, foram avaliadas por método espectrofotométrico à temperatura de 30°C como descrito previamente (DIMAURO et al., 1987). A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram corrigidos de acordo com o peso, expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de peso molhado do tecido. Os resultados foram também

corrigidos de acordo com a atividade da citrato sintase como uma medida estimada da massa mitocondrial.

4.2.5.2 Consumo de O₂ mitocondrial

O consumo de O₂ foi realizado em fibras permeabilizadas com saponina e em amostras de tecido muscular homogeneizado.

4.2.5.2.1 Fibra muscular permeabilizada

Para avaliação do consumo de O₂ mitocondrial, de 1 a 4 mg de fibras permeabilizadas foram adicionados à cuba do respirômetro de alta resolução (Oxygraph-2k, Oroboros, Innsbruck, Austria) contendo 2 mL da solução MiR0.5 com temperatura de 37°C, sob agitação.

Foram utilizadas duas variações do mesmo protocolo: A primeira adicionando sequencialmente o ADP (5 mM), o malato (2 mM), o glutamato (10 mM), o piruvato (5 mM), a rotenona (1 µM), o succinato (10 mM), o citocromo c (10 µM) e antimicina A (2,5 µM). A segunda adicionando sequencialmente o ADP (5 mM), a rotenona (1 µM), o succinato (10 mM), o citocromo c (10 µM), a antimicina A (2,5 µM), o TMPD (0,5 mM) e o ascorbato (2 mM) e o KCN (1 mM) ou a azida sódica (100 mM) (PESTA & GNAIGER, 2012).

Os dados foram adquiridos e analisados pelo pacote de *software* DatLab. Para fins quantitativos, os resultados foram corrigidos de acordo com o peso, expressos em pmolO₂/seg/mg de peso molhado do tecido.

4.2.5.2.2 Tecido muscular homogeneizado

Para avaliação do consumo de O₂ mitocondrial, 60 µL do homogeneizado (correspondendo a 6 mg de tecido molhado) em solução BIOPS foram adicionados à cuba do respirômetro de alta resolução (Oxygraph-2k, Oroboros, Innsbruck, Austria) contendo 2 mL da solução MiR0.5, que é constituída por 0,5 mM de EGTA, 3 mM de MgCl₂·H₂O, 60 mM de lactobionato de potássio, 20 mM de taurina, 10 mM de KH₂PO₄, 20 mM de HEPES, 110 mM de sacarose, 1 g/l de BSA e pH 7.1, com temperatura de 37°C sob agitação.

Os protocolos de titulação de substratos e inibidores da CTE foram elaborados tendo em vista a atividade do CI, do CII e CIV como aceptores iniciais de elétrons. Foram utilizados dois protocolos de titulação dos substratos e inibidores:

Protocolo 1: Utilizamos como substratos o citocromo *c* (10 μ M), o NADH (100 μ M), o malato (2 mM), o piruvato (5 mM), o glutamato (10 mM), o succinato (10 mM), o TMPD (0,5 mM) e o ascorbato (2 mM), e como inibidores a rotenona (1 μ M), o malonato (5 mM), a antimicina A (2,5 μ M), o KCN (1 mM) e a azida sódica (100 mM) adicionados sequencialmente (PESTA & GNAIGER, 2012).

Protocolo padrão: Adicionamos sequencialmente o citocromo *c* (10 μ M), o NAD⁺ (100 μ M), o malato (2 mM) e o acetil CoA (150 μ M) como substratos, e a rotenona (1 μ M), o malonato (5 mM), a antimicina A (2,5 μ M) como inibidores.

Os dados foram adquiridos e analisados pelo *software* DatLab. Para fins quantitativos, os resultados foram corrigidos de acordo com o peso, expressos em pmol/seg/mg de peso molhado do tecido, e também pela atividade da citrato sintase. Os resultados do consumo de O₂ foram calculados subtraindo o valor do estado inibido daquele obtido no estado energizado.

4.2.6 Oxidação do NADH

Os tecidos musculares homogeneizados (3 mg/mL) foram incubados em 2 mL de meio Mir0.5 a 37°C sob agitação, sendo monitorados por 10 minutos nos comprimentos de onda de 360 nm para excitação e 450 nm para emissão, utilizando fluorímetro Hitachi F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Tokio, Japan) com fenda *slit* 5/5. A oxidação do NADH foi monitorada pela diminuição da intensidade de fluorescência emitida após sua adição ao meio.

4.7 Análise estatística

As variáveis numéricas foram descritas através da mediana como medida central, e a medida de dispersão representada com valores mínimos, máximos e erro padrão. A comparação entre os grupos foi realizada através dos testes não paramétricos de Mann-Whitney (dois grupos) e Kruskal-Wallis (três grupos) com teste *post-hoc* de Dunn. A correlação entre as variáveis numéricas foi realizada através do coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman. A magnitude da correlação foi

estabelecida de acordo com o proposto por Ajzen (1998): $\leq 0,20$ muito baixa; 0,21-0,40 baixa; 0,41-0,60 moderada; 0,61-0,80 alta; 0,81-1,0 muito alta. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (IBM SPSS *software*) versão 17.0. O programa utilizado para a construção dos gráficos foi o *GraphPad Prism* versão 5.01.

5. RESULTADOS

5.1 Casuística

Para a realização deste estudo foram selecionados 24 pacientes, sendo quatro do grupo paciente com DM, 13 do grupo paciente com IE e deleções múltiplas do mtDNA e sete do grupo controle. A tabela 1 sumariza os dados demográficos de cada grupo.

Tabela 1: Dados demográficos de pacientes com doença mitocondrial, pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA e pacientes controles.

		Grupo DM	Grupo IE	Grupo controle
Idade de início				
(anos)		9,5 (3 – 15)	40 (22 – 54)*	23 (14 – 47)
Med (mín-máx)				
Idade na biópsia				
(anos)		24 (8 – 42)	49 (37 – 58)*	36 (17 – 48)
Med (mín-máx)				
Gênero (n)	M	3	5	4
	F	1	8	3

Med = mediana; min = mínimo; máx = máximo; M = masculino; F = feminino

DM = doença mitocondrial; IE = intolerância ao exercício; * = $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle.

Constituíram o grupo DM quatro pacientes com diagnóstico estabelecido de doença mitocondrial resultante de mutação no mtDNA, dois com quadro de MELAS e dois com PEO. Os pacientes com diagnóstico de MELAS apresentaram desenvolvimento neuropsicomotor normal, mas os primeiros sintomas já na infância, sendo o quadro caracterizado por encefalopatia progressiva com crises epiléticas, episódios semelhantes a AVC e ataxia. Surdez neurosensorial, retinose pigmentar, baixa estatura e neuropatia periférica axonal ocorreram em um dos pacientes, enquanto que o outro cursou com perda visual em decorrência de lesões no córtex occipital. Dos pacientes com PEO, um apresentava acometimento isolado da musculatura esquelética, com predomínio do envolvimento na

musculatura ocular, e o outro um quadro multissistêmico com miopatia, cardiopatia caracterizada por bloqueio átrio-ventricular total e hipoacusia neurosensorial.

Dentre os pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA, o sintoma inicial relatado foi predominantemente a mialgia. Um paciente relatou fadiga muscular além da mialgia, e outro relatou crises epilépticas. A queixa principal, ou seja, aquela que mais incomoda os pacientes no momento atual da doença, é a mialgia. Além da mialgia, dois pacientes relataram câimbras. Os sintomas associados citados foram variados, ocorrendo depressão, cefaleia, vertigem, alteração visual, disfunção erétil. Dentre as comorbidades relatadas estão insônia, ansiedade, depressão, síndrome da apneia obstrutiva do sono (SAOS), doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e lipomas intradurais. Foi relatada endocrinopatia por três pacientes, um com hipotireoidismo, um com *diabetes mellitus* e um com resistência periférica à insulina.

As dosagens séricas da enzima creatinaquinase e do lactato foram realizadas no decorrer do acompanhamento clínico dos pacientes no ANEM. Sete pacientes apresentaram dosagens séricas aumentadas da enzima creatinaquinase. Os valores do grupo variaram de 58 a 895 U/L (mediana 264,5 U/L), sendo os valores normais até 174 U/L para o sexo feminino e 190 U/L para o sexo masculino. Nove dos 13 pacientes apresentaram dosagem sérica de lactato aumentada, especialmente após esforço físico leve, que consistiu de 10 a 15 minutos de caminhada. Os valores de lactato de repouso variaram de 1,5 a 6,8 mmol/L, sendo a mediana de 2,5; já os valores de lactato de esforço variaram de 1,9 a 9,5 mmol/L, sendo a mediana de 5,5.

O grupo controle foi constituído por sete pacientes, dos quais dois apresentavam síndrome miastênica congênita, um apresentava canalopatia (miotonia congênita), um mononeurite múltipla sem processo inflamatório na biópsia muscular e três pacientes com quadros inespecíficos sem diagnóstico etiológico estabelecido (um com escoliose, outro com fraqueza muscular leve e outro com mialgia e artralgia).

A comparação das idades no momento da biópsia muscular mostrou diferença significativa entre pacientes IE e controles, o que nos levou a realizar uma primeira análise com a totalidade das amostras de pacientes IE e controles, e uma segunda análise com as amostras correspondentes aos pacientes de idades semelhantes, com mediana de 38 (32 - 48) no grupo controle e 43 (37 - 49) no grupo de pacientes IE com deleções múltiplas no mtDNA, sendo $p > 0,05$.

5.2 Avaliação histopatológica do músculo esquelético

Os pacientes do grupo DM apresentaram alterações marcantes à biópsia muscular, indicando importante disfunção mitocondrial. Nos pacientes com MELAS foram observadas várias fibras *ragged red* COX positivas, enquanto que nos pacientes com PEO as várias fibras *ragged red* presentes apresentaram atividade da COX ausente (fibras COX negativas).

Os achados à biópsia muscular dos pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA consistiram de anormalidades discretas e em geral inespecíficas. Chamou a atenção que a maioria dos pacientes apresentou fibras com aumento subsarcolemal de mitocôndrias. Os achados estão descritos na tabela 2 e ilustrados nas figuras 2 até a 7.

Tabela 2. Achados à biópsia muscular esquelética de pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA

Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Atrofia de fibras				+		+					++		+
Internalização nuclear											+		+
Acúmulo de lipídeo	+		+			+		+	+		++		
Acúmulo de glicogênio							+			+	+		+
Desorganização interna da fibra	+		++			+		++			++		++
Aumento subsarcolemal de mitocôndrias	++	++	+	+	+	++	+			++	+	++	
Fibras COX negativas	1	1	1		1				raras	raras	1		
Marcação lisossomal			++		+			++	++				+
ATPases		Atrofia FT2B									Atrofia FT2B e ↑FT2	↑FT2	↑FT2

A atrofia e internalização nuclear foram visualizadas pela coloração hematoxilina e eosina; os lipídeos foram visualizados pela coloração *oil red O*; as estrias de glicogênio foram visualizadas pela coloração do ácido periódico de Schiff; a desorganização interna da fibra foi constatada pela presença de fibras reticuladas, fibras em saca-bocado e fibras com core centrado, corados pela reação histoenzimológica para a NADH; o aumento subsarcolemal de mitocôndrias foi visualizado pela coloração do tricrômico de Gomori modificado e reação histoenzimológica para a SDH e para a COX; as fibras COX- foram constatadas pela ausência de reação para a COX; + = leve aumento; ++ = aumento moderado; FT2B = fibras do tipo 2B; FT2 = fibras do tipo 2; ↑ = predomínio.

Figura 2. Cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina. A- fibras de tamanho normal de um paciente do grupo controle; **B-** algumas fibras levemente atróficas em um paciente do grupo IE; **C-** predomínio de fibras atróficas em um paciente com MELAS do grupo DM. Chama a atenção também nesse fragmento a presença de algumas fibras com acúmulo de material basofílico especialmente na porção subsarcolemal, correspondendo a um aumento do número de mitocôndrias (setas).

Figura 3. Cortes histológicos corados pelo tricrômico de Gomori modificado. A- fibras sem acúmulo de material vermelho em um paciente do grupo controle; B- uma fibra com acúmulo subsarcolemal de material vermelho num paciente do grupo IE (seta); C- duas fibras *ragged red* em um paciente com MELAS do grupo DM (setas).

Figura 4. Cortes histológicos corados pela reação para a succinato desidrogenase. A- fibras normais sem aumento da atividade da SDH em um paciente do grupo controle; **B-** cinco fibras com discreto aumento subsarcolemal da atividade da SDH em um paciente do grupo IE (setas); **C-** três fibras *ragged red* com intenso aumento subsarcolemal da atividade da SDH em um paciente com PEO do grupo DM (setas).

Figura 5. Cortes histológicos corados pela reação para a COX. A- fibras normais coradas e sem aumento da atividade da COX em um paciente do grupo controle; B- algumas fibras com discreto aumento subsarcolemal da atividade da COX em um paciente do grupo IE (setas); C- várias fibras COX negativas em um paciente com PEO do grupo DM (setas); D- várias fibras com aumento subsarcolemal da atividade da COX em um paciente com MELAS do grupo DM (setas).

Figura 6. Cortes histológicos corados pela oil red O. A- fibras normais sem acúmulo de lipídeos em um paciente do grupo controle; B- algumas fibras com leve acúmulo de lipídeos em um paciente do grupo IE (setas).

Figura 7. Achados histológicos do músculo esquelético de um paciente com IE e deleções múltiplas do mtDNA. A- Reação histoenzimológica para a NADH mostrando algumas fibras reticuladas; B- Uma fibra que não se corou pela reação histoenzimológica para a COX (COX-); C- Reação histoenzimológica para a SDH mostrando algumas fibras com leve aumento subsarcolemal de mitocôndrias; D- Coloração *oil red O* mostrando algumas fibras com leve acúmulo de lipídeos.

Embora esses achados possam ocorrer no contexto de uma doença metabólica, apresentaram intensidade discreta, não permitindo por si só definir o diagnóstico.

5.3 Procedimento de homogeneização das amostras

O procedimento de homogeneização no equipamento utilizado, foi avaliado em amostras de diferentes tamanhos, cujos pesos variaram de 20 mg a 100 mg. Observamos que a homogeneização de fragmentos menores que 45 mg foi insatisfatória, resultando em ruídos excessivos na avaliação do consumo de O_2 .

Para a escolha do meio de homogeneização dos fragmentos obtidos de biópsia congelada, duas amostras do mesmo indivíduo foram homogeneizadas: uma em meio CPT e a outra em meio BIOPS. Cada amostra foi analisada quanto ao consumo de O_2 , por três vezes em meio MiR05, com intervalos de 10 minutos. Dois

pacientes do grupo controle foram selecionados e quatro experimentos independentes realizados.

Os dois meios de homogeneização conservam a capacidade de consumo de O_2 das amostras em até 10 minutos de armazenamento em banho de gelo. Porém, foi observada uma queda brusca de atividade após 10 minutos de armazenamento no meio CPT em banho de gelo. Já o meio BIOPS mantém a viabilidade da amostra por um período superior, mas não é adequada a análise após um período de 20 minutos, mesmo estando em banho de gelo. Portanto foi selecionado o meio BIOPS para prosseguir com os experimentos de consumo de O_2 .

Apesar dos ensaios enzimáticos não apresentarem diferença significativa quando as amostras foram homogeneizadas nos meios CPT ou BIOPS, prosseguimos os experimentos com o meio BIOPS, para aproveitar a mesma amostra que foi utilizada no consumo de O_2 .

5.4 Ensaios enzimáticos dos complexos da cadeia transportadora de elétrons

As atividades dos complexos enzimáticos da CTE e a atividade da citrato sintase (CS) dos 13 pacientes com IE e deleções múltiplas do mtDNA, 4 pacientes DM e 7 controles estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Ensaios enzimáticos da CTE e citrato sintase

	Controles		Grupo IE		Grupo DM	
	Med	(mín – max)	Med	(mín – max)	Med	(mín – max)
Citrato sintase	12,5	(10,63 – 15,63)	14,9	(9,39 – 20,50)	20,7*	(17,63 – 49,7)
CI	0,42	(0,22 – 0,55)	0,32	(0,15 – 0,38)	0,14*	(0,01 – 0,17)
CII	0,58	(0,28 – 0,93)	0,35	(0,22 – 0,71)	0,23*	(0,20 – 0,27)
CII + CIII	0,16	(0,11 – 0,20)	0,13	(0,08 – 0,23)	0,12	(0,11 – 0,15)
CIII	0,48	(0,27 – 0,52)	0,35	(0,20 – 0,54)	0,23*	(0,21 – 0,26)
CIV	0,73	(0,43 – 0,77)	0,44*#	(0,26 – 0,76)	0,26*	(0,21 – 0,29)

Resultados apresentados com Med = mediana, mín = mínimo e max = máximo; os valores referentes à citrato sintase foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido; os valores referentes aos complexos enzimáticos estão corrigidos pela citrato sintase; para controles o $n = 7$, grupo IE $n = 13$ (exceto em CII, onde o $n = 12$) e grupo DM $n = 4$; as diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$ em relação aos controles estão representadas por * e # em relação ao grupo DM. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados em meio específico para cada reação, com composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

Embora a análise estatística tenha evidenciado diferença significativa em relação aos controles apenas na atividade do CIV do grupo dos pacientes IE, cinco pacientes do grupo IE apresentaram atividade do CIII (corrigida pela atividade da citrato sintase) abaixo do valor mínimo dos controles e três pacientes apresentaram deficiência em dois ou mais complexos enzimáticos. Observa-se uma tendência à deficiência dos complexos I, II e III (valores de p de 0,08, 0,07 e 0,06, respectivamente). A redução na atividade do CII foi observada nos dois pacientes com maior elevação da atividade da citrato sintase, podendo decorrer da falta de linearidade da reação. O CII + CIII, além de refletir a atividade dos complexos II e III, representa indiretamente os níveis de coenzima Q (CoQ), não sendo observada diferença significativa em nenhum dos grupos. Todos os outros parâmetros apresentaram diferença significativa no grupo de pacientes DM, inclusive quando comparado com o grupo de pacientes IE.

5.5 Estabelecimento do método de consumo de O_2 dos complexos da CTE em homogeneizados de biópsias congeladas

5.5.1 Avaliação do consumo de O_2 em fibras musculares permeabilizadas de biópsias congeladas

O protocolo utilizado nas fibras musculares foi elaborado com a finalidade de avaliar a resposta ao substrato e inibidor adicionados, sendo estes os reagentes usualmente utilizados em experimentos de consumo de O_2 . Foram realizados 15 experimentos em duplicata utilizando cinco amostras de três pacientes do grupo controle. Quando adicionados os substratos que doam elétrons ao CI da CTE, não foi observado aumento relevante na velocidade de consumo do O_2 pelas fibras permeabilizadas (dado não apresentado). Contudo, foi observado um aumento significativo do consumo de O_2 à adição de succinato e TMPD/ascorbato, que doam elétrons respectivamente ao CII e CIV da CTE. A tabela 4 resume os valores da velocidade de consumo do O_2 antes e após a adição dos substratos.

Tabela 4. Consumo do O₂ em fibras permeabilizadas de biópsias congeladas segundo o substrato adicionado.

	Controle 1	Controle 2	Controle 3
Basal			
Mediana (mín/máx)	1,9 (0,1 – 8,5)	1,8 (0,1 – 5,3)	5,7 (3 – 6,9)
Erro padrão	0,5	1,3	0,8
Succinato			
Mediana (mín/máx)	18 (10,2 – 35)	20,9 (17,1 – 22)	31,5 (19,3–44,5)
Erro padrão	1,2	1,1	5,2
TMPD/ascorbato			
Mediana (mín/máx)	185 (107,7 – 250)	111,9 (51,6–170,4)	297 (192–426)
Erro padrão	15,3	31,9	53

Resultados expressos em pmolO₂/seg/mg de tecido molhado já descontados os valores da antimicina A e KCN ou azida sódica; mín = mínimo; máx = máximo; As fibras foram avaliadas em duplicata no meio MIR05 com composição e ensaios descritos em materiais e métodos.

Todas as amostras responderam aos inibidores adicionados. A variabilidade dos resultados nos levou a optar pela utilização do tecido muscular homogeneizado.

5.5.2 Avaliação do consumo de O₂ em homogeneizados de biópsias congeladas segundo o substrato adicionado

Os homogeneizados de músculo esquelético apresentaram um padrão de resposta aos substratos distinto dos obtidos com as fibras permeabilizadas. Foram realizados 9 experimentos em duplicata do mesmo paciente do grupo controle. A tabela 5 resume os valores da velocidade de consumo do O₂ após a adição dos substratos.

Tabela 5. Consumo de O₂ em homogeneizados de biópsias musculares congeladas segundo o substrato adicionado.

Substrato	Consumo de O₂	Erro padrão
	Mediana (Mínimo – Máximo)	
Sem adição	2 (0,1 – 8,2)	1,1
+ Citocromo c	6,6 (4,3 – 11,8)	1,3
+ NADH	7,2 (3,1 – 19,3)	2,4
+ malato + piruvato	5,5 (0,8 – 16)	1,8
+ glutamato	5,35 (5 – 6,6)	0,4
+ succinato	26,6 (10,8 – 31)	2,7
+ TMPD e ascorbato	114,5 (46,8 – 216,5)	44,5
Sem adição	0,61 (0,14 – 1,21)	0,4
+ Citocromo c, NAD⁺, Malato e acetil CoA	20 (16,1 – 26,4)	1,3

Resultados expressos em pmolO₂/seg/mg de tecido molhado já descontados os valores da antimicina A e KCN ou azida sódica; Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05, de composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

O NADH por si só e combinado com o malato, o piruvato e o glutamato, não aumentou significativamente o consumo de O_2 . A partir da adição de succinato observa-se um aumento do consumo de O_2 . O TMPD/ascorbato resultou no maior valor de consumo de O_2 , mas também apresentou elevada variação e erro padrão.

O malato, quando combinado com acetil CoA, aumentou de forma significativa e reprodutível o consumo de O_2 , exibindo o menor erro padrão apresentado.

A reposta do consumo de O_2 à adição de acetil CoA é possível em decorrência da lesão das membranas mitocondriais durante o processo de congelamento da amostra, já evidenciada por outros autores (LARSEN et al., 2012).

5.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão dos homogeneizados

A MET permite visualizar a integridade das membranas mitocondriais, portanto, foi realizada com o intuito de explicar a adequada resposta do consumo de O_2 ao acetil CoA. Essa molécula não é capaz de atravessar espontaneamente membranas íntegras. A figura 8 mostra a MET de um homogeneizado do grupo controle e um homogeneizado de paciente do grupo DM.

Figura 8. Ultraestrutura de mitocôndrias em homogeneizados de biópsias congeladas previamente. Micrografias eletrônicas representativas mostrando a ultraestrutura mitocondrial de homogeneizados de músculo esquelético em pacientes do grupo controle (**A**) e DM (**B**). As setas indicam as membranas duplas rompidas das mitocôndrias, enquanto as cabeças de seta indicam mitocôndrias com membranas mais preservadas. Barra de escala = 0,5 μm com aumento de 100.000x.

Embora os métodos de congelamento e homogeneização, de certa forma, preservem a estrutura mitocondrial de ao menos algumas das organelas, eles também causam fissuras nas membranas. Essas fissuras levam ao aumento da permeabilidade das membranas mitocondriais, resultando em mitocôndrias alteradas, observadas em **A''**, **B'** e **B''**. Elas conseqüentemente expõem a membrana mitocondrial interna ao meio extramitocondrial, como observado em **A**, **A'** e **B**.

5.5.4 Avaliação da oxidação do NADH em homogeneizados de biópsias congeladas.

Para confirmar a hipótese de que a fragmentação das membranas mitocondriais, decorrentes do processo de congelamento do tecido, levava à comunicação do conteúdo intra e extra mitocondrial, com consequente consumo de NADH em vias metabólicas sarcoplasmáticas, procedemos à mensuração da oxidação do NADH.

Foram realizados três experimentos usando amostra de tecido muscular homogeneizado do mesmo paciente do grupo controle. O NADH, quando adicionado ao meio MiR0.5 em presença dos homogeneizados, aumentou a emissão de fluorescência, em função da concentração de NADH adicionada. Subsequentemente a fluorescência diminuiu uniformemente até zero, indicando que o NADH estava sendo oxidado. Levando em conta este desvio metabólico para outras desidrogenases presentes e a adequada resposta ao malato e acetil CoA como substratos, elaboramos o protocolo que foi o padrão nas análises do consumo de O₂.

5.5.5 Avaliação do consumo de O₂ em homogeneizados de biópsias frescas e congeladas de controles utilizando o protocolo padrão

Foram realizados 4 experimentos de consumo de O₂, em duplicata, utilizando o protocolo padrão em amostras de dois pacientes. Os experimentos com amostras frescas e congeladas de um mesmo paciente foram realizados consecutivamente no mesmo dia, com análise inicial das amostras frescas e subsequentemente das amostras congeladas.

Os homogeneizados de músculo esquelético fresco e congelado apresentaram padrão distinto de resposta ao protocolo 2, que contém acetil CoA, conforme apresentado na figura 9, que mostra a comparação do consumo de O₂ de homogeneizados de biópsias fresca e congelada do mesmo paciente. Esses resultados demonstram que a fragmentação das membranas mitocondriais decorreu do processo de congelamento da amostra e não ao procedimento de homogeneização realizado.

Figura 9. Comparação de homogeneizado de amostra fresca e congelada do mesmo indivíduo. Ilustração dos traçados representativos do consumo de O₂ mostrando a diferença após adição do acetil CoA. As setas pretas indicam as adições sequenciais de citocromo c (C), β-NAD (N), malato (M), acetil CoA (A CoA), rotenona (R), malonato (Ma), e antimicina A (AA); as taxas de consumo de O₂ foram medidas ao longo do tempo contado em minutos. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e avaliados no meio MIR05, de composições e ensaios descritos em materiais e métodos, n=2.

Ao adicionar o acetil CoA, observa-se que somente o homogeneizado da biópsia congelada responde de forma a elevar significativamente a velocidade de consumo de O₂. As amostras frescas, por possuírem membranas mais íntegras, não absorvem substratos de alto peso molecular e polares, como no caso do acetil CoA.

Para também termos um senso da magnitude do consumo de O₂ na amostra fresca homogeneizada, além dos substratos do protocolo padrão, foi adicionado o piruvato (5 mM) (resultado não ilustrado). A velocidade média de consumo de O₂ após a adição de piruvato foi semelhante ao da amostra congelada da figura 9, sendo 6,4 pmol/seg/mg de peso molhado de tecido e 0,8 pmol/seg/CS, e 3 pmol/seg/mg e 0,38 pmol/seg/CS a média sem adição do piruvato. A amostra respondeu à adição do citocromo c e foi inibida pela rotenona, pelo malonato e pela antimicina A, tendo uma média de 1,1 pmols/seg/mg depois da inibição total. O experimento foi realizado em duplicata, com amostras de um único paciente.

A partir dos achados descritos no presente item, seguimos com a utilização do protocolo padrão para a análise do consumo de O₂ nos homogeneizados de controles e pacientes do grupo DM e grupo IE, uma vez que as amostras foram congeladas previamente.

5.5.6 Análise do consumo de O₂ em homogeneizados de controles e pacientes com DM

Nesta etapa foram utilizados fragmentos congelados de biópsias de 7 controles e 4 pacientes DM. A figura 10 mostra a ilustração de um traçado representativo do consumo de O₂ dos homogeneizados, com emprego do protocolo padrão.

Figura 10. Consumo de O₂ em homogeneizado de músculo esquelético congelado. Ilustração de um traçado representativo do consumo de O₂ de um homogeneizado do grupo controle. O gráfico superior indica a concentração de oxigênio e o gráfico inferior indica a velocidade do consumo de O₂. As setas pretas indicam as adições sequenciais de citocromo c (C), β-NAD (N) e malato (M), para o consumo de O₂ basal; acetil CoA (A CoA), para o consumo de O₂ com o meio energizado; rotenona (R), para o consumo de O₂ com o CI inibido; malonato (Ma), e antimicina A (AA), para o consumo de O₂ com a CTE inibida. As taxas de consumo de O₂ foram medidas ao longo do tempo contado em minutos. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05, de composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

Com exceção de duas amostras do grupo controle, todas as amostras responderam ao citocromo c com aumento na velocidade de consumo de O₂. O aumento foi em média de 10% nos homogeneizados do grupo controle e de 60% nos homogeneizados do grupo pacientes do grupo DM. A adição de malato e acetil CoA aumenta ao máximo a velocidade de redução do O₂ a H₂O. A adição sequencial dos inibidores diminui a velocidade desta reação até inibição total da CTE. Dois homogeneizados do grupo controle não responderam à adição da rotenona, indicando que já estavam com o CI inibido.

A diferença estatística só é possível ser visualizada quando as taxas do consumo de O₂ são normalizadas pela citrato sintase de cada amostra, conforme mostrado na figura 11.

Figura 11. Diferença no consumo de O₂ de homogeneizados do grupo controle e DM. Os gráficos em barras mostram as medianas e variâncias das taxas de consumo de O₂ basal, energizado e energizado acrescido de rotenona, já descontados os valores do consumo de O₂ com a CTE inibida. As diferenças estatísticas estão indicadas no gráfico em * com $p = 0,01$ e ** com $p = 0,0061$ de acordo com o teste de Mann-Whitney, sendo $n=7$ nos controles e $n=4$ nos pacientes DM. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05, de composições e ensaios descritos em materiais e métodos, num total de onze experimentos independentes.

O aumento no número de mitocôndrias observado nas mitocondriopatias mascara o resultado por miligrama de tecido. Ao dividir estes valores pela atividade da CS, obtemos um valor estimado do consumo de O₂ de cada mitocôndria, sendo drasticamente menor nos pacientes do grupo DM. A mediana dos valores da CS no grupo controle foi de 13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido molhado muscular, sendo 22 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ no grupo DM.

Como o sistema de transferência de elétrons pode ser dividido em duas correntes que se convergem à coenzima Q (HATEFI et al., 1962), podemos calcular as velocidades do consumo de O₂ da CTE de três maneiras (tabela 6).

Tabela 6. Comparação do consumo de O₂ da CTE do grupo controle e DM

	Controle		DM	
complexos	Med	(mín – max)	Med	(mín – max)
CI ao CIV	0,23	(0 – 0,49)	0,1	(0,04 – 0,16)
CII ao CIV	0,27	(0,14 – 0,39)	0,09*	(0,09 – 0,11)
CI+CII ao CIV	0,43	(0,35 – 0,70)	0,18*	(0,14 – 0,25)

Resultados apresentados com Med = mediana, mín = mínimo e max = máximo; os valores estão corrigidos pela citrato sintase, expressos em $\text{pmolO}_2/\text{seg}/\text{CS}$; para controles o $n = 7$ e pacientes DM $n = 4$; as diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$ estão representadas por * de acordo com o teste de Mann-Whitney. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05 com composições e ensaios descritos em materiais e métodos, num total de 11 experimentos independentes.

Após a energização do meio com malato e acetil CoA, tanto o CI quanto CII estão disponíveis para transportar os elétrons vindo do NADH e FADH_2 . Ao adicionar a rotenona, somente a via do CII está disponível para transportar os elétrons, de modo que a diferença entre essas duas medidas correspondem ao fluxo via CI. Nos dois grupos, a soma das medianas dos fluxos de CI ao CIV e de CII ao CIV foi ligeiramente maior que CI+CII ao CIV. Apesar da mediana do fluxo de CI ao CIV ser maior no grupo controle, não há diferença estatística, pois os valores mínimos estão muito próximos do grupo dos pacientes DM. Devido a essa instabilidade, descartamos esse parâmetro para a avaliação da CTE nos pacientes do grupo IE.

5.6 Estudo da cadeia transportadora de elétrons na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas no DNA mitocondrial

O estudo da CTE foi realizado avaliando a atividade enzimática dos complexos de forma isolada via espectrofotometria, apresentados no item 5.4 e através do consumo de O_2 via eletrodo de alta resolução.

5.6.1 Avaliação dos complexos da CTE pelo consumo de O_2

Nesta etapa foram utilizados fragmentos congelados de biópsias musculares de 7 controles, 4 pacientes DM e 13 pacientes IE com deleções múltiplas no mtDNA. A figura 12 mostram as velocidades do consumo de O_2 dos pacientes IE com deleções múltiplas no mtDNA, pacientes DM e controles, com os valores dos fluxos demonstrados na tabela 7.

Figura 12. Avaliação do consumo de O₂ da CTE de pacientes IE, pacientes DM e controles. Os gráficos em barras mostram as medianas e variâncias das taxas de consumo de O₂ basal, energizado por malato e acetil CoA e depois de adicionar a rotenona (E+ROT) em homogeneizados musculares, num total de 24 experimentos independentes. Os valores do consumo de O₂ com a CTE inibida já estão descontados. As diferenças estatísticas em relação aos controles estão indicadas no gráfico em * e # em relação ao grupo DM, com $p \leq 0.05$ de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn, sendo $n = 7$ nos controles, $n = 13$ nos pacientes IE e $n = 4$ nos pacientes DM. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05, de composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

Tabela 7. Comparação do consumo de O₂ da CTE do grupo controle, IE e DM

	Controle	IE	DM
Complexos da CTE	Med (mín – max)	Med (mín – max)	Med (mín – max)
CII ao CIV	0,27 (0,14 – 0,39)	0,16*#(0,11–0,22)	0,09* (0,09 – 0,11)
CI+CII ao CIV	0,43 (0,35 – 0,70)	0,29*#(0,15–0,47)	0,18* (0,14 – 0,25)

Resultados apresentados com Med = mediana, mín = mínimo e max = máximo; os valores estão corrigidos pela citrato sintase, expressos em pmolO₂/seg/CS; para controles $n = 7$, pacientes IE $n = 13$ e pacientes DM $n = 4$; as diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$ estão representadas por * em relação aos controles e # em relação ao grupo DM, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05 com composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

O grupo IE exibiu diferença significativa em relação ao grupo controle no consumo de O₂ no estado energizado, representado pelo fluxo de elétrons do CI+CII ao CIV, e depois de adicionado rotenona, representado pelo fluxo de elétrons do CII ao CIV. Quando comparado aos pacientes DM também houve diferença nas duas condições. O grupo DM por sua vez exibiu diferença aos controles em todas as condições, inclusive no consumo de O₂ basal.

5.6.2 Avaliação da CTE nos grupos com idades semelhantes

Levando em consideração que a idade pode influenciar na atividade da CTE, nesta etapa foram considerados apenas os resultados referentes aos fragmentos

congelados de biópsias musculares de 5 controles, 4 pacientes DM e 7 pacientes IE com deleções múltiplas no mtDNA, todos com idades semelhantes no momento da coleta da biópsia de músculo. As tabelas 8 e 9 juntamente com a figura 13 mostram a atividade dos complexos da CTE pelos métodos enzimáticos e consumo de O_2 .

Tabela 8. Ensaio enzimático da CTE e citrato sintase dos grupos com idades semelhantes

	Controles		Grupo IE		Grupo DM	
	Med	(mín – max)	Med	(mín – max)	Med	(mín – max)
Citrato sintase	12,5	(10,63 – 15,63)	15,6	(10,8 – 20,5)	20,7*	(17,63 – 49,7)
CI	0,45	(0,29 – 0,55)	0,33#	(0,15 – 0,37)	0,14*	(0,01 – 0,17)
CII	0,58	(0,5 – 0,93)	0,33	(0,22 – 0,6)	0,23*	(0,20 – 0,27)
CII + CIII	0,16	(0,14 – 0,20)	0,12	(0,08 – 0,23)	0,12	(0,11 – 0,15)
CIII	0,48	(0,41 – 0,52)	0,25	(0,20 – 0,54)	0,23*	(0,21 – 0,26)
CIV	0,75	(0,57 – 0,77)	0,37	(0,26 – 0,76)	0,26*	(0,21 – 0,29)

Resultados apresentados com Med = mediana, mín = mínimo e max = máximo; os valores referentes à citrato sintase foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido; os valores referentes aos complexos enzimáticos estão corrigidos pela citrato sintase; para controles o $n = 5$, grupo IE $n = 7$ (exceto em CII, onde o $n = 6$) e grupo DM $n = 4$; as diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$ em relação aos controles estão representadas por * e # em relação ao grupo DM. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados em meio específico para cada reação, com composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

Figura 13. Avaliação do consumo de O_2 da CTE de pacientes IE, pacientes DM e controles com idades semelhantes. Os gráficos em barras mostram as medianas e variâncias das taxas de consumo de O_2 basal, energizado por malato e acetil CoA e depois de adicionar a rotenona (E+ROT) em homogeneizados musculares, num total de 16 experimentos independentes. Os valores do consumo de O_2 com a CTE inibida já estão descontados. As diferenças estatísticas em relação aos controles estão indicadas no gráfico em * e # em relação ao grupo DM, com $p \leq 0,05$ de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn, sendo $n = 5$ nos controles, $n = 7$ nos pacientes IE e $n = 4$ nos pacientes DM. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05, de composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

Tabela 9. Comparação do consumo de O₂ da CTE do grupo controle, IE e DM com idades semelhantes

	Controle		IE		DM	
Complexos da CTE	Med	(mín – max)	Med	(mín – max)	Med	(mín – max)
CII ao CIV	0,29	(0,14 – 0,39)	0,14#	(0,11 – 0,17)	0,09*	(0,09 – 0,11)
CI+CII ao CIV	0,43	(0,39 – 0,59)	0,25*	(0,15 – 0,36)	0,18*	(0,14 – 0,25)

Resultados apresentados com Med = mediana, mín = mínimo e max = máximo; os valores estão corrigidos pela citrato sintase, expressos em pmolO₂/seg/CS; para controles o n = 5, pacientes IE n = 7 e pacientes DM n = 4; as diferenças estatísticas com $p \leq 0,05$ estão representadas por * em relação aos controles e # em relação ao grupo DM, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn. Os fragmentos foram homogeneizados no meio BIOPS e foram avaliados no meio MIR05 com composições e ensaios descritos em materiais e métodos.

Os ensaios enzimáticos não são capazes de diferenciar os pacientes do grupo IE com deleções múltiplas no mtDNA dos pacientes do grupo controle em indivíduos com idades semelhantes, apesar de ter diferenciado os pacientes IE dos pacientes DM quanto à atividade do CI ($p = 0,04$). No entanto, as diferenças entre os três grupos se mantiveram no consumo de O₂ no estado basal e energizado da CTE. Observa-se também uma forte tendência à diferenciação no estado energizado acrescido de rotenona (fluxo dos elétrons de CII ao CIV) entre o grupo controle e grupo paciente IE ($p = 0,06$). Neste mesmo parâmetro foi possível a diferenciação entre os pacientes IE e pacientes DM, com $p = 0,02$.

5.6.3 Teste de correlação entre a atividade dos complexos da CTE e a atividade enzimática dos complexos da CTE e citrato sintase.

As atividades da CTE, obtidas pelo cálculo do consumo de O₂, e as atividades de cada complexo da CTE analisados individualmente correlacionaram positivamente com coeficiente de correlação maior que 0,50 (tabela 10), representando uma função crescente.

Tabela 10. Correlação entre o consumo de O₂ e ensaios enzimáticos dos complexos individuais da CTE e citrato sintase

		CS	CI	CII	CII + CIII	CIII	CIV
CII ao CIV	ρ	-0,525**	0,527**	0,564**	0,431*	0,56**	0,743**
	p	0,008	0,008	0,005	0,035	0,004	0
	n	24	24	24	24	24	24
CI+CII ao CIV	ρ	-0,725**	0,511*	0,707**	0,07	0,553**	0,632**
	p	0	0,011	0	0,745	0,005	0,001
	n	24	24	24	24	24	24

ρ = Coeficiente de correlação; p = nível de significância; n = número de indivíduos

Como a atividade enzimática de CII + CIII reflete, além da atividade dos complexos II e III, os níveis de coenzima Q reduzidas no CII e oxidadas no CIII, houve apenas correlação com o consumo de O₂ do CII ao CIV. A correlação dos complexos da CTE com a atividade da CS foi de intensidade maior que 0,50 e negativa, representando uma função decrescente.

As correlações observadas são de moderada a alta magnitude indicando que os dois experimentos mensuram fenômenos semelhantes. Dessa forma o teste de correlação valida o experimento de consumo de O₂ nas amostras congeladas.

6. DISCUSSÃO

A investigação de um paciente com suspeita de defeito na CTE requer uma combinação dos estudos clínico, morfológico, bioquímico e genético (BIRCH-MACHIN et al, 1994). No estudo bioquímico, além da atividade dos complexos da CTE analisados de forma isolada por espectrofotômetro, nós investigamos um meio de mensurar a atividade da CTE pelo consumo de O_2 via eletrodo de alta resolução.

As fibras permeabilizadas são um modelo já consagrado na literatura por preservarem a arquitetura mitocondrial (PICARD et al, 2011), porém o congelamento inviabiliza a análise do consumo de O_2 pela fosforilação oxidativa (LARSEN et al, 2012). A técnica de separação das fibras musculares, particularmente nas biópsias descongeladas, foi difícil de ser empregada devida às alterações estruturais das fibras. Esta dificuldade refletiu no tempo de preparo de cada amostra, podendo estar também relacionada com a variação dos resultados.

Optamos por realizar os experimentos de consumo de O_2 em biópsias congeladas e homogeneizadas pelo equipamento do tipo *Turrax*, o qual homogeniza o tecido através da fragmentação, diferentemente do homogeneizador tipo *Potter*, que homogeniza pelo esmagamento. Observamos que a presença de tecido não homogeneizado, principalmente o conjuntivo, resulta em um traçado com, praticamente, nenhuma resposta ao substrato ou inibidor adicionado, apresentando bastante ruído durante todo o experimento.

Os meios de homogeneização BIOPS e CPT foram testados analisando a faixa de tempo em que é preservada a viabilidade das amostras, quando mantidas em banho de gelo. Este fator é importante, pois nem sempre o laboratório de processamento da amostra é o mesmo ao qual a amostra será analisada, sendo necessário o armazenamento e transporte do homogeneizado. O meio BIOPS preservou melhor a amostra, provavelmente por conter o tampão 2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic acid potassium salt (KMES) com pKa de 6,1 (25⁰C), possuindo uma faixa de tamponamento de pH de 5,5 a 6,7; conter o *dithiothreitol* (DTT), que é um agente redutor que protege os grupamentos –SH livres da oxidação no procedimento de homogeneização, e ATP + PCr como fontes de energia química. Em contraste, o meio CPT possui apenas o tampão TRIS-HCl para proteger a amostra, tendo o pKa = 6,5 (25⁰C) com faixa de tamponamento semelhante ao tampão KMES do BIOPS.

Como o congelamento não é um procedimento padrão para experimentos de consumo de O_2 , analisamos inicialmente a resposta de um fragmento homogeneizado de músculo fresco de dois indivíduos do grupo controle, em comparação ao fragmento congelado do mesmo indivíduo, colhidos no mesmo procedimento de biópsia muscular. A ultra-estrutura dos homogeneizados mostra que os procedimentos de congelamento-descongelamento e homogeneização da amostra criam fissuras nas membranas mitocondriais, expondo suas enzimas aos substratos. Isto pode explicar a resposta aos acetil CoA observada nos homogeneizados derivados de amostras congeladas, não observada nos homogeneizados derivados de amostras frescas. Estes dados estão de acordo com o estudo de Birch-Machin e colaboradores (1994), que avaliaram vários métodos de ruptura de membranas, chegando à conclusão de que o congelamento-descongelamento das mitocôndrias é um procedimento crucial na quantificação da atividade das enzimas da CTE e CS. Apesar da análise ultraestrutural demonstrar ruptura das membranas mitocondriais, ela não foi delineada para analisar de forma quantitativa essa alteração. Mesmo com a observação de mitocôndrias relativamente íntegras, ou seja, com rupturas em suas membranas mas mantendo ainda uma estruturação que nos permite reconhecer a organela, não é possível dizer em que proporção ocorreu esse grau de preservação. Experimentos adicionais serão necessários para determinar variabilidades nesse processo e sua influência nos resultados de consumo de O_2 .

Os homogeneizados tiveram um padrão de resposta aos substratos adicionados diferente das fibras permeabilizadas. Embora tenham respondido aos substratos doadores de elétrons ao CI, não houve uma reprodutibilidade satisfatória. Os experimentos da oxidação do NADH revelaram que ocorre um desvio da sua utilização pela CTE para outras enzimas desidrogenases do sarcoplasma, incluindo as envolvidas na produção de lactato, prejudicando a utilização dos substratos via CI da CTE. O conjunto de substratos mais satisfatórios na energização da CTE e na reprodutibilidade do procedimento, foi o malato e o acetil CoA. Ao adicionar acetil CoA e malato como substratos, reativamos o ciclo de Krebs, que pode metabolizar o acetil CoA de forma cíclica em até oito passos. Quatro dos oito passos desse processo são oxidações, e a energia delas liberada é conservada com alta eficiência, na forma das coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$. Estas coenzimas reduzidas doam seus prótons e elétrons para os complexos enzimáticos da CTE por

reações de oxido-redução, iniciadas pelo CI (utilizando NADH) e CII (utilizando FADH_2). Ao chegar no CIV os elétrons reduzem o O_2 molecular a H_2O , consumindo assim o O_2 do meio.

O citocromo *c* deve fazer parte do *pool* de substratos quando pretende-se analisar as amostras homogeneizadas pela respirometria de alta resolução. Praticamente todas as nossas amostras responderam à sua adição com aumento na velocidade de consumo de O_2 , inclusive na amostra obtida de tecido fresco, indicando sua perda no procedimento de homogeneização. Este aumento é notadamente maior nas amostras do grupo DM, que possuem mitocôndrias defeituosas, podendo refletir uma deficiência deste componente relacionada com a doença. O NAD^+ , além de ser um efector positivo para as enzimas do ciclo de Krebs, pode impedir o desvio do caminho metabólico para outras enzimas desidrogenases.

Os traçados, quando normalizados por peso molhado, não apresentam diferença significativa entre os grupos, pois a proliferação mitocondrial observada nos pacientes compensa em parte a deficiência do consumo de O_2 . Contudo, o protocolo desenvolvido tem sensibilidade para diferenciar indivíduos com mitocondriopatias de indivíduos normais, quando corrigimos as taxas do consumo de O_2 pela CS de cada amostra. A possibilidade de correção dos valores do consumo de O_2 por um parâmetro que represente a massa mitocondrial, como é o caso da CS, traz uma vantagem adicional ao método que utiliza os homogeneizados de tecido, uma vez que indivíduos com doença mitocondrial podem apresentar intensa proliferação desta organela (Sobreira et al., 1997). As atividades da CS dos pacientes do grupo DM do presente estudo confirmam a importância da correção adequada dos valores de velocidade de consumo de O_2 , assim como de outros parâmetros de função da CTE.

A insensibilidade à rotenona das amostras de dois indivíduos do grupo controle pode ter decorrido de uma falha técnica, sugerindo que houve um comprometimento da transferência de elétrons do CI ao CIII, ou um desvio do NADH para outras enzimas desidrogenases. Como a atividade enzimática de forma isolada nos dois indivíduos estava normal, a detecção de disfunções do CI por este método pode ser dificultada, sendo necessária a confirmação por outros métodos. Mesmo com esta instabilidade do CI, o método foi capaz de diferenciar os pacientes com doença mitocondrial dos controles. Contudo, mais experimentos são necessários para definir exatamente a contribuição do CI no consumo de O_2 .

A intolerância ao exercício é um problema relevante na prática clínica, tanto por sua elevada prevalência (CARVALHO, 2012), quanto pelo difícil manejo desse grupo de pacientes. A dificuldade advém não apenas por se tratar de um sintoma subjetivo, difícil de ser avaliado e quantificado, advém também do fato que ainda não é possível definir o diagnóstico etiológico para a maioria dos pacientes com tal sintoma, especialmente se de ocorrência isolada. Por isso, são indivíduos que têm sua condição clínica frequentemente negligenciada tanto pela sociedade, incluindo os familiares, quanto pelo sistema de saúde.

A identificação de deleções múltiplas do mtDNA em pacientes com IE foi feita pela primeira vez por Ohno e colaboradores (1991), quando descreveram o quadro clínico-laboratorial de dois irmãos com mioglobínúria recorrente, desencadeada pelo esforço físico. Nos anos subsequentes não foi observada uma evolução no reconhecimento da associação de deleções múltiplas do mtDNA com quadros isolados de IE. No contexto de uma síndrome clínica na qual a definição do diagnóstico etiológico não é alcançada com frequência, reconhecer o processo patológico envolvido na gênese do quadro clínico pode ser considerado um grande passo. Entretanto, a ocorrência de deleções múltiplas do mtDNA é em si um achado inespecífico. Além de sua associação a defeitos genéticos em genes nucleares responsáveis pela replicação e manutenção do mtDNA, pode advir de processos patológicos secundários, como já demonstrado em miopatias crônicas de natureza adquirida (SANTORELLI et al., 1996; CRAIG et al., 2012).

À biópsia muscular predominaram os achados leves e inespecíficos, como esperado no contexto da IE como quadro isolado. Nossa avaliação está de acordo com a de Filosto et al. (2007), que analisaram 240 biópsias musculares de pacientes com mialgia isolada, relacionada ou não ao exercício, encontrando os mesmos tipos de alterações em mais da metade dos pacientes. A ocorrência de proliferação mitocondrial com mais de 2% de RRF em qualquer idade, mais de 2% de fibras COX- de pacientes com menos de 50 anos ou mais de 5% para aqueles com mais de 50 anos, foram propostos como critério histopatológico no diagnóstico de doenças da CTE (FILOSTO et al., 2007; KYRIAKIDES et al., 2013). Portanto, a presença de alterações mitocondriais, mesmo que discretas, como o aumento da atividade da SDH na porção subsarcolemal das fibras, indicando proliferação mitocondrial, ou a presença de fibras COX- sugere um comprometimento da função da organela neste grupo de pacientes. Contudo, tais achados não são suficientes

para que se estabeleça o diagnóstico de doença mitocondrial, sendo necessário demonstrar de forma mais evidente a disfunção da organela.

No contexto da disfunção mitocondrial relacionada a deleções múltiplas do mtDNA, espera-se comprometimento da OXPHOS, já que, conforme enfatizado na introdução, o mtDNA possui exclusivamente genes necessários à expressão de subunidades proteicas da CTE e da ATPase mitocondrial.

Com relação à atividade das enzimas da CTE, o grupo de pacientes IE apresentou significativa redução da atividade da COX, quando comparada ao grupo controle. Devemos ressaltar que o grupo controle neste trabalho, por se tratar de exame laboratorial invasivo em decorrência da necessidade de coleta de fragmento de músculo esquelético, é constituído por pacientes submetidos à biópsia muscular no processo de investigação diagnóstica de sua condição clínica. São, portanto, pacientes nos quais não se observam alterações relevantes à biópsia muscular e para os quais não há suspeita diagnóstica de doença metabólica. Tais condições restringem a constituição do grupo controle, assim como dificultam a obtenção de situações ideais de controle, como a paridade por faixa etária. De fato, o grupo controle apresentou faixa etária semelhante ao grupo DM, mas faixa etária significativamente menor em relação ao grupo de pacientes com IE e deleções múltiplas no mtDNA. Como a função mitocondrial pode ser afetada pelo envelhecimento, optamos por adicionar análise considerando indivíduos com idade semelhante no momento da biópsia muscular. Nessa análise, a diferença na atividade da COX previamente demonstrada não se confirmou, reafirmando que a avaliação da atividade da CTE através de ensaios enzimáticos isolados não é um método eficaz para o diagnóstico desses pacientes.

A ausência de alteração significativa da função isolada dos complexos enzimáticos responsáveis pela OXPHOS pode ser explicada por uma baixa proporção de moléculas mutantes, já que as deleções múltiplas do mtDNA foram identificadas pelo método de PCR, capaz de amplificar quantidades mínimas de DNA. Pode decorrer também, do fato de que a variação na localização das deleções em diferentes moléculas de mtDNA permita que haja complementação funcional entre essas moléculas.

Pequenas variações na atividade de cada um dos complexos, isoladamente, podem não ser identificadas pela mensuração isolada da atividade dos complexos da CTE. Entretanto, a somatória dessas alterações, quando mensuradas por um

método que avalie de forma mais abrangente a CTE, como é o caso da quantificação do consumo de O_2 , favorece a identificação da alteração funcional.

De fato, a deficiência no consumo de O_2 se mostrou evidente, mesmo os grupos com idades semelhantes, tendo o grupo IE apresentado uma redução nos estados basal e energizado, em relação ao grupo controle. Mesmo sendo uma alteração mais leve quando comparado aos pacientes DM, a identificação da diminuição do consumo de O_2 reforça a importância das deleções múltiplas do mtDNA no contexto da doença desses pacientes.

Os exames enzimáticos da CTE e de consumo do O_2 correlacionaram positivamente de moderada a alta magnitude, sendo complementares na avaliação do funcionamento da CTE. A correlação negativa com a CS indica que enquanto a atividade desta aumenta, a atividade da CTE diminui. Esta correlação reflete o aumento subsarcolemal de mitocôndrias visualizadas nas reações histoenzimológicas para a SDH e COX e coloração do tricrômico de Gomori modificado, como uma medida compensatória da fibra muscular de suprir a demanda energética, já que as mitocôndrias são defeituosas.

Portanto, consideramos que o presente estudo resultou em achados relevantes que nos guiarão no delineamento de novas abordagens para o esclarecimento dos processos patológicos envolvidos na gênese das deleções múltiplas no mtDNA. Nosso trabalho também reforça que a investigação da disfunção mitocondrial deve sempre ter mais de um critério de avaliação. Os exames clínico-laboratoriais, a avaliação do consumo de O_2 , juntamente com a avaliação da atividade de cada complexo de forma isolada, têm um maior poder de diagnóstico que estes critérios analisados separadamente.

7- CONCLUSÕES

- O protocolo desenvolvido para a avaliação dos complexos enzimáticos da CTE por respirometria de alta resolução (consumo de O_2 sem acoplamento da fosforilação oxidativa), a partir de homogeneizados de biópsias de músculo esquelético congeladas previamente é reprodutível quando analisado o fluxo de elétrons do CI+CII ao CIV e do CII ao CIV, e confiável no estudo da função mitocondrial;

- A avaliação clínico-laboratorial do grupo de pacientes com intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas do mtDNA mostrou evidências de que as deleções múltiplas do genoma mitocondrial são, em parte, responsáveis pelo desenvolvimento da intolerância ao exercício apresentada pelos pacientes. As principais evidências que corroboram esta afirmação são a constatação clínica da mialgia e fadiga muscular, a presença de sinais laboratoriais indicando comprometimento da fibra muscular, como a identificação de deficiência do consumo de O_2 pela CTE e a proliferação mitocondrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJZEN, I. **Understanding attitudes and predicting social behavior**. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, p. 97-99, 1998.

ALSTON, C.L.; ROCHA, M.C.; LAX, N.Z.; TURNBULL, D.M.; TAYLOR, R.W. The genetics and pathology of mitochondrial disease. **J Pathol**, v. 241, n. 2, p. 236-250, 2017.

ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.G.; BRUIJN, M.H.L.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.H.; STADEN, R.; YOUNG, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457-465, 1981.

BIRCH-MACHIN, M.A.; BRIGGS, H.L.; SABORIDO, A.A.; BINDOFF, L.A.; TURNBULL, D.M. An evaluation of the measurement of the activities of complexes I-IV in the respiratory chain of human skeletal muscle mitochondria. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 51, p. 35-42, 1994.

BERNE; LEVY; KOEPPEN; STANTON. **Fisiologia**. 5ª edição. Elsevier, 2004.

BONILLA, E.; SCIACCO, M.; TANJI, K; SPARACO, M.; PETRUZZELLA, V.; MORAES, C.T. New morphological approaches to the study of mitochondrial encephalomyopathies. **Brain Pathol**, v. 2, p. 113-119, 1992.

CARROZZO, R.; HIRANO, M.; FROMENTY, B.; CASALI, C.; SANTORELLI, F. M.; BONILLA, E.; DIMAURO, S.; SCHON, E. A.; MIRANDA, A.F. Multiple mtDNA deletions features in autosomal dominant and recessive diseases suggest distinct pathogenesis. **Neurology**, v. 50, n. 1, p. 99-106, 1998.

CARVALHO, E.H.T. **Caracterização clínica e função mitocondrial na intolerância ao exercício de origem muscular**. 2012. 148 f. + CD-ROM. Tese (Doutorado em Neurologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. **J Biol Chem.**, v. 221, p. 477–489, 1956.

CRAIG, K.; YOUNG, M.J.; BLAKELY, E.L; LONGLEY, M.J; TURNBULL, D.M.; COPELAND, W.C.; TAYLOR, R.W. A p.R369G *POLG2* mutation associated with adPEO and multiple mtDNA deletions causes decreased affinity between polymerase γ subunits. **Mitochondrion**, v. 12, n. 2, p. 1-15, 2012.

DARIN, N.; OLDFORS, A.; MOSLEMI, A.R.; HOLME, E.; TULINIUS, M. The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical and DNA abnormalities. **Ann Neurol** v. 49, p. 377-383, 2001.

DIMAURO, S.; ANDREU, A. Mutations in mitochondrial DNA as a cause of exercise intolerance. **Annals of Medicine**, v. 33, n. 7, p. 472-476, 2001.

DIMAURO, S.; HIRANO, M. MELAS. **GeneReviews**, Initial Posting: February 27, 2001; Last Update: November 21, 2013.

DIMAURO, S.; SCHON, E.A. Mitochondrial Respiratory- Chain Diseases. **N Engl J Med**, v. 348, p. 2656-68, 2003.

DIMAURO, S.; SERVIDEI, S.; ZEVIANI, M.; DIROCCO, M.; DEVIVO, D.C.; DIDONATO, S.; UZIEL, G.; BERRY, K.; HOGANSON, G.; JOHNSEN, S.D. Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. **Ann Neurol**, v. 22, p. 498-506, 1987.

FILOSTO, M.; TONIN, P.; VATTEMI G.; BERTOLASI, L.; SIMONATI A.; RIZZUTO N.; TOMELLERI G. The role of muscle biopsy in investigating isolated muscle pain. **Neurology**, v. 68, n. 3, p. 181-186, 2007.

FISTERER, J.; DRORY, V. Wet, volatile, and dry biomarkers of exercise –induced muscle fatigue. **BMC Musculoskeletal disorders**, v.17, p. 40, 2016.

FLAHERTY, K. R.; WALD, J.; WEISMAN, I.M.; ZEBALLOS, R.J.; SCHORK, M.A.; BLAIVAS, M.; RUBENFIRE, M.; MARTINEZ, F.J. Unexplained exertional limitation: characterization of patients with a mitochondrial myopathy. **Am J Resp Crit Care Med** v.164, p. 425-432, 2001.

GELLERICH, F.N.; MAYR, J.A.; REUTER, S.; SPERL, W.; ZIERZ S. The problem of interlab variation in methods for mitochondrial disease diagnosis: enzymatic measurement of respiratory chain complexes. **Mitochondrion** v. 4, p. 427–439, 2004.

GOLDENTHAL, M.J.; KURUVILLA, T.; DAMLE, S.; SALGANICOFF, L.; SHETH, S.; SHAH, N.; MARKS, H.; KHURANA, D.; VALENCIA, I.; LEGIDO, A. Non-invasive evaluation of buccal respiratory chain enzyme dysfunction in mitochondrial disease: Comparison with studies in muscle biopsy. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 105, p. 457-462, 2012.

GORMAN, G.S.; CHINNERY, P.F.; DIMAURO, S.; HIRANO, M.; KOGA, Y.; MCFARLAND, R.; SUOMALAINEN, A.; THORBURN, D.R.; ZEVIANI, M.; TURNBULL, D.M. Mitochondrial diseases. **Nature Reviews Disease Primers** v. 2, article n. 16080, 2016.

GORMAN, G.S.; SCHAEFER, A.M.; NG, Y.; GOMEZ, N.; BLAKELY, E.L.; ALSTON, C.L.; FEENEY, C.; HORVATH, R.; YU-WAI-MAN, P.; CHINNERY, P.F.; TAYLOR, R.W.; TURNBULL, D.M.; MCFARLAND, R. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. **Ann Neurol.**, v. 77, n. 5, p. 753-759, 2015.

HATEFI, Y.; HAAVIK, A.G.; FOWLER, L.R.; GRIFFITHS, D.E. Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transport system. **J Biol Chem.**, v. 237, p. 2661-2669, 1962.

HE, J.; FORD, H.C.; CARROLL, J.; DOUGLAS, C.; GONZALES, E.; DING, S.; FEARNLEY, I.M.; WALKER, J.E. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 12, p. 2988-2993, 2018.

JANSSEN, A.J.M.; SMEITINK, J.A.M.; VAN DEN HEUVEL, L.P. Some practical aspects of providing a diagnostic service for respiratory chain defects. **Ann Clin Biochem**, v. 40, p. 3-8, 2003.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia básica**. 10^a edição. Guanabara Koogan, 2006.

KADENBACH, B.; HÜTTEMANN, M. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. **Mitochondrion** v. 24, p. 64-76, 2015.

KAUKONEN, J.; JUSELIOUS, J.K.; TIRANTI, V.; KYTTÄLÄ, A.; ZEVIANI, M.; COMI, G.P.; KERÄNEN, S.; PELTONEN, L.; SUOMALAINEN, A. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. **Science**, v. 289, p. 5, 2000.

KEIGHTLEY, J. A.; ANITORI, R.; BURTON, M. D.; QUAN, F.; BUIST, N. R. M.; KENNAWAY, N. G. mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the cytochrome *b* gene. **Am J Hum Genet**, v. 67, p. 1400-1410, 2000.

KIRBY, D.M.; THORBURN, D.R.; TURNBULL, D.M.; TAYLOR, R.W. Biochemical Assays of Respiratory Chain Complex Activity. **Methods in Cell Biology**, v. 80, p. 93-119, 2007.

KUZNETSOV, A.V.; VEKSLER, V.; GELLERICH, F.N.; SAKS, V.; MARGREITER, R.; KUNZ, W.S. Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. **Nature Protocols**, v. 3, p. 965 – 976, 2008.

KYRIAKIDES, T.; ANGELINI, C.; SCHAEFER, J.; MONGINI, T.; SICILIANO, G.; SACCONI, S.; JOSEPH, J.; BURGUNDER, J.M.; BINDOFF, L.A.; VISSING, J.; DE VISSER, M.; HILTON-JONES, D. EFNS review on the role of muscle biopsy in the investigation of myalgia. **European Journal of Neurology**, v. 20, p. 997-1005, 2013.

LAFORÊT, P.; VIANEY-SABAN, C. Disorders of muscle lipid metabolism: Diagnostic and therapeutic challenges. **Neuromuscular Disorders**, v. 20, p. 693-700, 2010.

LAPUENTE-BRUN, E.; MORENO-LOSHUERTOS, R.; ACÍN-PÉREZ, R.; LATORRE-PELLICER, A.; COLÁS, C.; Balsa, E.; PERALES-CLEMENTE, E.; QUIRÓS, P.M.; CALVO, E.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, M.A.; NAVAS, P.; CRUZ, R.; CARRACEDO, Á.; LÓPEZ-OTÍN, C.; PÉREZ-MARTOS, A.; FERNÁNDEZ-SILVA, P.; FERNÁNDEZ-VIZARRA, E.; ENRÍQUES, J.A. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. **Science**, v. 340, p. 1567-1570, 2013.

LARSEN, S.; KRAUNSE, R.; GRAM, M.; GNAIGER, E.; HELGE, J.W.; DELA, F. The best approach: Homogenization or manual permeabilization of human skeletal muscle fibers for respirometry? **Analytical Biochemistry** v. 446, p. 64–68, 2014.

LARSEN, S.; WRIGHT-PARADIS, C.; GNAIGER, E.; HELGE, J.; BOUSHEL, R. Cryopreservation of human skeletal muscle impairs mitochondrial function. **CryoLetters**, v. 33, p. 169-175, 2012.

LENAZ, G.; TIOLI, G.; FALASCA, A.I.; GENOVA, M.L. Complex I function in mitochondrial supercomplexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1857, p. 991-1000, 2016.

LIU, F.; LÖSSL, P.; RABBITTS, B.M.; BALABAN, R.S.; HECK, A.J.R. The interactome of intact mitochondria by cross-linking mass spectrometry provides evidence for coexisting respiratory supercomplexes. **Mol Cell Proteomics.**, v. 17, n. 2, p. 216-232, 2018.

LOWRY, O.H.; ROSEBROOUGH, N.J.; FARR, A.C.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

Lu, Y.; ZHAO, D.; YAO, S.; WU, S.; HONG, D.; WANG, Q.; LIU J.; SMEITINK, J.A.M.; YUAN, Y.; WANG, Z. Mitochondrial tRNA genes are hotspots for mutations in a cohort of patients with exercise intolerance and mitochondrial myopathy. **J Neurol Sci**, v. 379, p. 137-143, 2017.

MANCUSO, M.; ANGELINI C.; BERTINI E.; CARELLI V.; COMI G.P.; MINETTI C.; MOGGIO M.; MONGINI T.; SERVIDEI S.; TONIN P.; TOSCANO A.; UZIEL G.; ZEVIANI M.; SICILIANO G. Fatigue and exercise intolerance in mitochondrial diseases. Literature revision and experience of the Italian Network of mitochondrial diseases. **Neuromuscular disorders**, v. 22, p. 226-229, 2012.

McNAMARA, J.W.; SADAYAPPAN, S. Skeletal myosin binding protein-C: An increasingly important regulator of striated muscle physiology. **Archives or Biochemistry and Biophysics**, v. 660, p. 121-128, 2018.

MENG, F.; HE, Z.; TANG, X.; ZHENG, J.; JIN, X.; ZHU, Y.; REN, X.; ZHOU, M.; WANG, M.; GONG, S.; MO, J.Q.; SHU, Q.; GUAN, M.X. Contribution of the tRNA^{Ile} 4317A→G mutation to the phenotypic manifestation of the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA 1555A→G mutation. **J Biol Chem**, v. 293, n. 9, p. 3321-3334, 2018.

MILENKOVIC, D.; BLAZA, J.N.; LARSSON, N.G.; HIRST, J. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 765-776, 2017.

MIRANDA, A.F.; PETERSON, E.R.; MASUROVSKI, E.B. Differential expression of creatine kinase and phosphoglycerate mutase isozymes during development in aneural and innervated human muscle culture. **Tissue Cell**, v. 20, p. 179-191, 1989.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144-148, 1961.

MUKAI, M.; SUGAYA, K.; MATSUBARA, S.; CAI, H.; YABE, I.; SASAKI, H.; NAKANO, I. Familial progressive external ophthalmoplegia, parkinsonism and polyneuropathy associated with POLG1 mutation. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 54, p. 22, 2014.

NELSON & COX. **Lehninger**: Princípios de bioquímica. 5ª edição. Sarvier, 2011.

OHNO, K.; TANAKA, M.; SAHASHI, K.; IBI, T.; SATO, W.; YAMAMOTO, T.; TAKAHASHI, A.; OZAWA, T. Mitochondrial DNA deletions in inherited recurrent myoglobinuria. **Ann Neurol.**, v. 29, p. 1091-1092, 1991.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. In: PALMEIRA, C.M.; MORENO, A.J. (Eds.). **Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols**. Springer Science+Business Media, 2012, v.810, cap. 3, p. 25-30.

PICARD, M.; TAIVASSALO, T.; RITCHIE, D.; WRIGHT, K.J.; THOMAS, M.M.; ROMESTAING, C.; HEPPLER, R.T. Mitochondrial Structure and Function Are Disrupted by Standard Isolation Methods. **PLoS One**, v.6, n. 3, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018317>.

QUINZII, C.M.; DIMAURO, S.; HIRANO, M. Human coenzyme Q10 deficiency. **Neurochem Res**, v. 32, p. 723-727, 2007.

RASMUSSEN, U.F.; KRUSTUP, P.; KJAER, M.; RASMUSSEN, H.N. Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging. A study of isolated human skeletal muscle mitochondria. **Experimental Gerontology** v. 38, p. 877-886, 2003.

ROBINSON, B.H.; MCKAY, N.; GOODYER, P.; LANCASTER, G. Defective Intramitochondrial NADH Oxidation in Skin Fibroblasts from an Infant with Fatal Neonatal Lacticacidemia. **Am J Hum Genet**, v. 37, p. 938-946, 1985.

RUSECKA, J.; KALISZEWSKA, M.; BARTNIK, E.; TONSKA, K. Nuclear genes involved in mitochondrial diseases caused by instability of mitochondrial DNA. **J Appl Genet**, v. 59, n. 1, p. 43-57, 2018.

SANTORELLI, F.M.; SCIACCO, M.; TANJI, K.; SHANSKE, S.; VU, T.H.; GOLZI, V.; GRIGGS, R.Z.; MENDELL, J.R.; HAYS, A.P.; BERTORINI, T.E.; PESTRONK, A.; BONILLA, E.; DIMAURO, S. Multiple mitochondrial DNA deletions in sporadic inclusion body myositis: A study of 56 patients. **Neurology**, v. 39, l. 6, p. 789-795, 1996.

SCHÄGGER, H.; PFEIFFER, K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. **The EMBO jornal**, v. 19, n. 8, p. 1777-1783, 2000.

SKALADAL, D.; HALLIDAY, J.; THORBURN, D.R. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. **Brain**, v. 126, p. 1905-1912, 2003.

SOBREIRA, C.; HIRANO, M.; SHANSKE, S.; KELLER, R.K.; HALLER, R.G.; DAVIDSON, E.; SANTORELLI, F.M.; MIRANDA, A.F.; BONILLA, E.; MOJON, D.S.; BARREIRA, A.A.; KING, M.P.; DIMAURO, S. Mitochondrial encephalomyopathy with coenzyme Q10 deficiency. **Neurology**, v. 48, p. 1238-1243, 1997.

SOBREIRA, C.; MARQUES JR., W.; BARREIRA, A.A. Myalgia as the revealing symptom of multicore disease and fiber type disproportion myopathy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 74, n. 9, p. 1317-1319, 2003.

SOIFERMAN, D.; AYALON, O.; WEISSMAN, S.; SAADA, A. The effect of small molecules on nuclear-encoded translation diseases. **Biochimie** v. 100, p. 184-191, 2014.

SPELBRINK, J.N.; LI, F.Y.; TIRANTI, V.; NIKALI, K.; YUAN, Q.P.; TARIQ, M.; WANROOIJ, S.; GARRIDO, N.; COMI, G.; MORANDI, L.; SANTORO, L.; TOSCANO, A.; FABRIZI, G.M.; SOMER, H.; CROXEN, R.; BEESON, D.; POULTON, J.; SUOMALAIN, A.; JACOBS, H.T.; ZEVIANI, M.; LARSSON, C. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. **Nat Genet.**, v. 223, p. 31, 2001.

SUOMALAINEN, A.; KAUKONEN, J.; AMATI, P.; TIMONEN, R.; HALTIA, M.; WEISSENBAACH, J.; ZEVIANI, M.; SOMER, H.; PELTONEN, L. An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA. **Nat Genet**, v. 146, p. 51, 1995.

THORBURN, D.R.; CHOW, C.W.; KIRBY, D.M. Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. **Mitochondrion** v. 4, p. 363-375, 2004.

TONKONOGI, M.; HARRIS, B.; SAHLIN, K. Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. **Journal of Physiology** v. 510, n. 1, p. 279-286, 1998.

VEKSLER, V.I.; KUZNETSOV, A.V.; SHAROV, V.G.; KAPELKO, V.I.; SAKS, V.A. Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 892, p. 191-196, 1987.

VIENNE, J.C.; CIMETTA, C.; DUBOIS, M.; DUBURCQ, T.; FAVORY, R.; DESSEIN, A.F.; FONTAINE, M.; JONCQUEL-CHEVALIER CURT, M.; CUISSET, J.M.; DOUILLARD, C.; MENTION-MULLIEZ, K.; DOBBELAERE, D.; VAMECQ, J. A fast method for high resolution oxymetry study of skeletal muscle mitochondrial respiratory chain complexes. **Analytical Biochemistry**, v.528, p.57-62, 2017.

VLADUTIU, G.D.; HEFFNER, R.R. Succinate dehydrogenase deficiency: A qualitative and quantitative assessment in muscle. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, p. 1755-1758, 2000.

ZEVIANI, M.; BONILLA, E.; DEVIVO, D.C.; DIMAURO, S. Mitochondrial diseases. **Neurol. Clin.**, v. 7, p. 123-156, 1989.

ZEVIANI, M.; DIDONATO, S. Mitochondrial disorders. **Brain**, v. 127, p. 2153-2172, 2004.

ZIMORSKI, V.; KU, C.; MARTIN, W.F.; GOULD, S.B. Endosymbiotic theory for organelle origins. **Curr Opin Microbiol**, v. 22, p. 38-48, 2014.

ANEXOS

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 22 de março de 2017.

Ofício nº 824/2017
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 15334/2016

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“FUNÇÃO MITOCONDRIAL NA INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO DECORRENTE DE DELEÇÕES MÚLTIPLAS DO DNA MITOCONDRIAL” – Projeto de Pesquisa Versão 2 – data da modificação 04/03/2017**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 446ª Reunião Ordinária realizada em 20/03/2017, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 – data da modificação 04/03/2017.**

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PROFª DRª CLÁUDIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

FELIPPE HENRIQUE ZUCCOLOTTO DOS REIS/PROFª DRª LUCIANE CARLA ALBERICI

Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

APÊNDICES

APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Depto. de Neurociências e Ciências do Comportamento FMRP-USP
Av. Bandeirantes, 3900. Ribeirão Preto-SP. CEP-14048-900
Tel. (16) 3602-2548

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Função mitocondrial na intolerância ao exercício decorrente de deleções múltiplas do DNA mitocondrial.

Pesquisadores responsáveis:

Cláudia Ferreira da Rosa Sobreira

Felippe Henrique Zuccolotto dos Reis

Luciane Carla Alberici

Convidamos o(a) Sr(a) para participar desta pesquisa. A participação é voluntária, portanto o(a) Sr(a) não receberá nenhum pagamento por participar da pesquisa.

Miopatias são doenças que agredem os músculos. Pessoas que têm uma miopatia podem apresentar fraqueza no músculo, dor muscular e fadiga, que é a sensação de cansaço que vem junto com a dor muscular depois de alguma atividade física. Esse conjunto de sintomas é chamado de **intolerância ao exercício**. Essa queixa é frequente nas pessoas que apresentam problema na produção de energia nos músculos. Esse problema pode ser causado por alteração em uma parte da célula que se chama mitocôndria, a qual é responsável pela maior parte da produção de energia do nosso corpo. Uma das situações que pode levar ao problema na produção de energia é herdada de família, ou seja, vem de uma alteração no gene ou DNA dessa parte da célula e que chamamos de “deleções múltiplas do DNA mitocondrial”. Nesta pesquisa, estamos estudando as causas e as consequências dessa alteração na produção de energia. Os objetivos desta pesquisa são:

- avaliar as queixas e as alterações nos exames laboratoriais que as pessoas com esse problema específico de produção de energia apresentam;
- avaliar o comprometimento da produção de energia no músculo, nas células cultivadas do músculo e na mucosa da boca;

- identificar a alteração genética que está causando esse problema.

Se o(a) Sr(a) aceitar participar, sua participação se dará através do seu consentimento para:

1. utilizarmos informações sobre a sua doença anotadas no prontuário médico;
2. utilizarmos parte da biópsia muscular que foi colhida durante a investigação da sua doença, inclusive para cultivar células vivas dessa biópsia;
3. colhermos material da parte de dentro da sua boca através de raspagem leve da bochecha com uma espátula de madeira descartável, no dia do seu retorno de rotina neste hospital, o que demora cerca de 15 minutos;
4. colhermos sangue de veia do seu braço, no dia do seu retorno de rotina neste hospital, o que demora cerca de 15 minutos.

Não haverá necessidade de comparecer ao hospital fora dos dias de retorno de rotina.

Não haverá benefícios imediatos aos participantes da pesquisa.

Os riscos pela participação na pesquisa referem-se:

1. ao incômodo da raspagem da mucosa da sua bochecha, que pode causar uma sensação ruim no momento da coleta e nas horas seguintes;
2. à dor e incômodo pela picada da agulha na coleta do sangue da veia do seu braço, podendo haver extravasamento e formação de hematoma no local.

Se o(a) Sr(a) aceitar participar, terá os seguintes direitos:

- A) Se depois de consentir em sua participação o Sr(a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo à sua pessoa;
- B) Sua identidade não será divulgada, sendo guardada em segredo;
- C) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa em questão;
- D) O compromisso de que será prestada qualquer informação durante o estudo, ainda que o(a) Sr(a) possa não querer mais participar do estudo;
- E) O compromisso de que não haverá nenhum gasto para o(a) Sr(a) ou para sua família, decorrente de qualquer etapa desta pesquisa.

Para qualquer outra informação, o(a) Sr(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores envolvidos pelos telefones (16) 3315-3312/3602-2548

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP e da FMRP-USP (16) 3602-2228

Ribeirão Preto, ____ de _____ de ____.

Participante: _____

RG: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

APÊNDICE B – Manuscrito a ser submetido à publicação em revista internacional com fator de impacto.

Oxygen consumption in frozen skeletal muscle samples differentiates mitochondrial disease patients from controls.

Authors: Felipe H. Zuccolotto dos Reis, Silvia Helena A. Escarso, Jackeline Araujo, Enilza M. Espreafico, Luciane C. Alberici, Cláudia R. F. Sobreira

Abstract

Introduction. Enzyme assays of mitochondrial respiratory chain complexes and measurement of oxygen consumption are key laboratory tests in the investigation of mitochondrial function. Respiratory chain enzyme assays are routinely performed in specialized laboratories and the use of either frozen or fresh samples are well described in the literature. However, oxygen consumption was not satisfactorily assayed in frozen tissue because the freezing procedure disrupts cellular and organelle membranes, causing leakage of mitochondrial membrane potential. Studies involving frozen tissues are important in clinical practice because it is possible to perform a longer sequence of tests; retest samples in subsequent moments; include stored control samples in the analysis (both normal and disease controls); analyze samples collected far away from the specialized centers.

Purpose. Therefore, the purpose of this study is to describe a new protocol for measuring oxygen consumption in human frozen skeletal muscle biopsies.

Methods. We selected 4 controls and 4 patients with mitochondrial diseases from the Neuromuscular Disease Clinic of the Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto – USP: 2 patients with m.3243A>G (MTL1) mutation and MELAS, and 2 patients with mtDNA single deletion and PEO.

Human frozen biopsies were weighed, a 10% weight/volume dilution was made with BOPS solution in ice and homogenated. Oxygen consumption was measured with high-resolution respirometer in MiRO5 buffer, and enzyme assays was performed using spectrophotometer in CPT buffer.

Our results showed significant difference in mitochondrial respiration between controls and patients when corrected for CS activity (colocar valor de p), as well as the enzyme assays (colocar valor de p). We concluded that

INTRODUCTION

Mitochondria are cellular organelles with a central role in cellular function and survival. Mitochondrial dysfunction is the cause of a complex and heterogeneous

group of diseases that affect single or multiple organ and tissues (DIMAURO & SCHON, 2003).

Mitochondrial diseases (MD) were initially considered rare disorders, but have been increasingly recognized as a cause of disease in humans (GORMAN et al., 2015). With time, distinct clinical pictures have been associated with this group of disease, encompassing both multisystem as well as single tissue involvement, characterizing highly variable phenotypes. In the absence of reliable biomarkers for these disorders, it is very important to measure mitochondrial function in affected tissues.

The diagnosis of MD in skeletal muscle requires preparation of the samples, and different approaches can be used: mitochondrial isolation (SCHNEIDER WC, 1948), permeabilized fibers (VEKSLER et al., 1987) or homogenate preparation (GROSS et al., 2011). Each technique has both positive and negative points. Mitochondrial isolation technique is widely used for the study of mitochondrial function, but approximately 40% of yield were reported (RASMUSSEN et al., 2003), requiring a larger amount of sample to perform the diagnostic assays. The permeabilized fibers are considered the best technique to study mitochondrial states of ETC, preserving approximately 95% of mitochondrion, but it was reported large interpersonal variation (TOKONOGI et al., 1998; LARSEN et al., 2012). Furthermore both techniques take 1 to 2 hours to prepare the sample (FREZZA et al., 2007; KUZNETSOV et al., 2008), limiting the amount of sample to analyze. The homogenate preparation technique is faster than the other techniques, and was reported a decrease in interpersonal variation with increase in reproducibility, (GROSS et al., 2011). However it is performed by using a mechanical grinder, which can reduce the viability of the sample, depending on the type of homogenizer machine used (LARSEN et al., 2014). We must consider all of these features, when we choose the sample preparation technique.

Freezing procedure of biopses samples are common in practical clinic as a way of storage. Although it makes mitochondria leaky, it is necessary in clinical research for many reasons: The patient's location might be different from the laboratory's location; it turns more practical to process large amount of samples; transportation from the laboratory of storage to laboratory of exam process. In our case, several patients get their diagnosis after the biopsy collection procedure. Furthermore, frozen biopses can be stable for over 10 years if the samples have been frozen quickly and stored in liquid nitrogen (THORBURN et al., 2004).

The impairment of mitochondrial function in frozen tissues is described in respirometry (OXPHOS) (LARSEN et al., 2012), but enzymatic assays of electron transport chain (ETC) are well described in both frozen and fresh skeletal muscle biopsy specimens (GELLERICH et al., 2002; THORBURN et al., 2004; MEDJA et al., 2009; RODENBURG et al., 2011; SPINAZZI et al., 2011). Although activities of isolated ETC complexes is very useful in identifying enzyme deficiencies and contributing to the diagnosis of MD, we believe that is very important demonstrate in a broader way the respiratory chain function by O₂ consumption, confirming the impairment and better characterizing the underlined metabolic defect. The aim of this study was create a protocol to measure the activity of ETC using frozen biopsies from patients with MD. We investigated the ETC activity of all complexes working together until the reduction of molecular oxygen. We reconstituted the Krebs cycle

adding acetyl CoA and malate as substrates to provide reduced coenzymes to ETC, and analyzed the oxygen consumption of controls and patients samples.

PATIENTS AND CONTROLS:

- 1.1) *Patients:* 4 patients from the Neuromuscular Disease Clinic of the Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto – USP submitted to muscle biopsy in the course of the routine investigation process of their diseases, being 2 patients with m.3243A>G (MTL1) mutation and MELAS, and 2 patients with mtDNA single deletion and PEO.
- 1.2) *Controls:* The normal control group consisted of 7 patients from the Neuromuscular Disease Clinic of the Clinical Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto - USP submitted to muscle biopsy in the course of the routine investigation process of their diseases and who do not present degenerative muscular disease, mitochondrial dysfunction or complaint of exercise intolerance. Control patients had been selected so that they present a similar age to the group of patients with mtDNA deletion or mutation.

The exclusion criteria were: Presence of an inflammatory process in muscle biopsy and use of medication that compromises mitochondrial function, especially antiretrovirals and statins

SAMPLES:

The samples of skeletal striated muscle tissue were obtained by open biopsy of the brachial biceps muscle under local anesthesia. A fragment is immediately frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored in liquid nitrogen for further analysis.

METHODS:

- 1.1) *Homogenate preparation:* Human skeletal muscle biopsies from m. biceps brachii were cryopreserved with isopentane in liquid nitrogen previously. The samples were taken out of their storage, weighed and a 10% weight/volume dilution was made with CPT solution or BIOPS solution in ice. CPT solution contains: 0.05 M TRIS-HCl, 0.15 M KCl, pH 7.5. BIOPS solution contains: 20 mM imidazole, 20 mM taurine, 50 mM KMES, 0.5 mM DTT, 10mM Ca-EGTA buffer, 6.56 mM MgCl₂, 5.77 mM ATP, 15 mM phosphocreatine, pH 7.1. Muscle biopsies were homogenated in ice with PowerGen 125 grinder (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) turned on at maximum position (30000rpm). This homogenizer cuts samples into smaller pieces and does not crush them, allowing better sample viability.
- 1.2) *Transmission electron microscopy (TEM):* After homogenization, the lysate was centrifuged 800g for 10min at 4°C to remove high debris. The supernatant was collected to and centrifuged again 9000g for 20min at 4°C. The resultant pellet was fixed with 2% glutaraldehyde, 2% formaldehyde, 0,5% CaCl₂ in PBS with CA⁺² and Mg⁺² for 2 hours at 4°C. Then cells were washed with 0,1M cacodylate buffer (pH 7,4) for 1h at 4°C. The fixed components were post-fixed with 1% OsO₄ for 2 hours at at 4°C, washed with H₂O and dehydrated in a graded series of ethanol (30% to 100%), infiltrated with propylene oxide and embedded in Embed 812 resin, polymerized for 72 hours at 60°C. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate for 10min and

examined with an electron microscope (Jeol JEM- 100 CXII). A unique experiment was analyzed. The images were processed and analyzed using NIH-developed Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD; available at <https://imagej.net>). For visualization purposes the contrast were modified using CLAHE plugin (Stephan Saalfeld, 2010; available at [https://imagej.net/Enhance_Local_Contrast_\(CLAHE\)](https://imagej.net/Enhance_Local_Contrast_(CLAHE))), maintaining the equivalent proportions for all the images.

- 1.3) *Enzyme assays of ETC*: The biochemical assays of the activity of the enzymes of the respiratory chain were performed considering the activity of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase and NADH ubiquinone reductase (complex I), succinate dehydrogenase (SDH) (complex II) , cytochrome c oxidase (COX) (complex IV), and citrate synthase, performed as described previously (DIMAURO et al, 1987), with minor modifications such as the use of crude homogenate of muscle tissue rather than supernatant. The concentration of proteins was evaluated by the method of Lowry (LOWRY et al, 1951). The results were corrected by weight, expressed as $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{g}$ wet weight of the tissue. The results were also corrected according to the activity of citrate synthase as an estimated measure of mitochondrial mass.
- 1.4) *Mitochondrial O_2 consumption protocol*: 60 μL (6 mg) of homogenates were transferred to the high-resolution respirometer (Oxygraph-2k, Oroboros, Innsbruck, Austria) with mitochondrial respiration buffer (MiR05) on 37°C. MiR05 contains: 20 mM Taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 1 g/l BSA, 0.5 mM EGTA, 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 60 mM K-lactobionate, pH 7.1. Then, we added cytochrome c (10 μM) to eventually provide its absence because of mitochondrial membrane rupture. Then we added NAD^+ (100 μM) to provide equal coenzyme concentration for all the samples, and to divert the metabolic pathway of lactate synthesis. Malate (2 mM) and acetyl CoA (150 μM) were added to reconstitute Krebs cycle function, with electron input through Complex I (CI) and Complex II (CII). Rotenone (1 μM) was added to inhibit CI, limiting substrate utilization to electron input through CII. Then malonate (5 mM) was added to inhibit CII and antimycin A (2.5 mM) to inhibit Complex III (CIII) electron transfer. Substrate and inhibitor titration protocols were employed in duplicate. The data were acquired and analyzed by the DatLab software package. For quantitative purposes, the results were corrected according to weight, expressed as $\text{pmol} / \text{sec} / 6\text{mg}$ wet weight of tissue, and also by the activity of citrate synthase.

RESULTS

1- Procedure for sample homogenization

The homogenization procedure in the equipment used was evaluated in samples of different sizes, whose weights ranged from 20 mg to 100 mg. We observed that the homogenization of fragments smaller than 45 mg was unsatisfactory, resulting in excessive noise in the evaluation of O_2 consumption.

For the choice of homogenization medium used in the enzyme assays and the CTE's O₂ consumption, frozen biopsy fragments obtained from two samples of the same individual were homogenised: one in CPT medium and the other in BIOPS medium. Each sample was analyzed three times on MiR05 medium, at 10 minute intervals. Two patients from the control group were selected and four independent experiments were performed.

The two homogenization media conserve the samples within 10 minutes of ice bath storage. However, a sudden drop in activity was observed after 10 minutes of storage in CPT medium. The BIOPS medium maintains the viability of the sample for a longer period, but the analysis is not adequate after a period of 20 minutes, even in an ice bath. Therefore, the BIOPS medium was selected to proceed with the O₂ consumption experiments.

Although the enzymatic assays did not present significant difference when the samples were homogenized in the CPT or BIOPS media, we continued the experiments with the CPT medium, since it is the standard homogenization medium used in the laboratory.

2- Enzymatic assays of electron transport chain complexes

The activities of CTE enzyme complexes and citrate synthase (CS) activity of patients with IE and multiple deletions of mtDNA, DM patients and controls are shown in table 1.

Table 1. Enzymatic assays of CTE and citrate synthase

	Controls		El group		MD group	
	Med	(min – max)	Med	(min – max)	Med	(min – max)
Citrate synthase	12,5	(10,63 – 15,63)	14,9	(9,39 – 20,50)	20,7*	(17,63 – 49,7)
CI	0,42	(0,22 – 0,55)	0,32	(0,15 – 0,38)	0,14*	(0,01 – 0,17)
CII	0,58	(0,28 – 0,93)	0,35	(0,22 – 0,71)	0,23*	(0,20 – 0,27)
CII + CIII	0,16	(0,11 – 0,20)	0,13	(0,08 – 0,23)	0,12	(0,11 – 0,15)
CIII	0,48	(0,27 – 0,52)	0,35	(0,20 – 0,54)	0,23*	(0,21 – 0,26)
CIV	0,73	(0,43 – 0,77)	0,44*	(0,26 – 0,76)	0,26*	(0,21 – 0,29)

Results presented with Med = median, min = minimum and max = maximum; citrate synthase values were expressed in $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{g tissue}$; the values for the enzymatic complexes are corrected by citrate synthase; for controls $n = 7$, group IE $n = 13$ (except in CII, where $n = 12$) and DM group $n = 4$; the statistical differences with $p \leq 0.05$ in relation to the controls are represented by *. The fragments were homogenized in CPT medium and evaluated in specific media for each reaction, with compositions and assays described in materials and methods.

Although the statistical analysis showed a significant difference in relation to the controls only in the CIV activity of the El group, five patients in the El group had CIII activity (corrected by the citrate synthase activity) below the minimum value of the controls and three patients presented deficiency in two or more enzyme complexes. A tendency to deficiency of complexes I, II and III is observed (p values of 0.08, 0.07 and 0.06, respectively). The reduction in CII activity was observed in the two patients with a higher elevation of citrate synthase activity, which could be due to the lack of linearity of the reaction. In addition to reflecting the activity of complexes II and III, CII

+ CIII represents indirectly the levels of coenzyme Q (CoQ), and no significant difference was observed in any of the groups. All other parameters showed a significant difference in the DM group, even when compared to the IE group.

3- Analysis of O₂ consumption and TEM in control homogenates and patients with DM

First we did a fresh and homogenized sample test to get a sense of the O₂ consumption's magnitude in this condition, which is the closest to reality. We used malate and pyruvate as substrates at the same concentrations as Larsen et al in their study. We obtained an average of 7.5 pmol/s*6mg homogenated of control after energization. The sample responded to cytochrome C and was inhibited by rotenone, malonate and antimycin A.

The frozen homogenated samples did not respond to the addition of pyruvate, requiring the use of acetyl CoA as substrate. The acetyl CoA does not work as substrate in fresh homogenates, because it does not cross intact mitochondrial membranes. Figure 1 shows TEM of homogenates from frozen samples.

Figure 1. Mitochondria ultrastructure in homogenates of previously frozen biopsies. Representative micrographs showing the mitochondrial ultrastructure of skeletal muscle homogenates in patients in the control (A) and DM (B) groups. The arrows indicate the ruptured double membranes of the mitochondria, while the arrow heads indicate

mitochondria with more preserved membranes. Scale bar = 0.5 μm with increase of 100,000x.

Although the freezing procedure preserved the mitochondrial structure, mitochondria have fissures and ruptures in their membranes. This condition allows the activation of Krebs cycle by acetyl CoA and malate as substrates. Figure 2 shows the O_2 consumption of homogenates from fresh and frozen samples. When adding acetyl CoA the fresh sample did not reach the energization.

Figure 2. Comparison of fresh and frozen sample homogenates of the same individual. Illustration of the traces representative of O_2 consumption showing the difference after addition of acetyl CoA. The black arrows indicate the sequential additions of cytochrome c (C), β -NAD (N), malate (M), acetyl CoA (A CoA), rotenone (R), malonate (Ma), and antimycin A (AA); O_2 consumption rates were measured over time counted in minutes. The fragments were homogenized in the BIOPS medium and evaluated in the MIR05 medium, compositions and assays described in materials and methods, $n = 2$.

Figure 3 shows a typical graph and the difference in O_2 consumption between patients and controls.

Figure 3. O_2 consumption in frozen skeletal muscle homogenate. Illustration of a plot of representative O_2 consumption of a control group homogenate. The upper graph indicates the oxygen concentration and the lower graph indicates the rate of O_2 consumption. The black arrows indicate the sequential additions of cytochrome c (C), β -NAD (N) and malate (M), for basal O_2 consumption; acetyl CoA (A CoA), for consumption of O_2 with the energized medium; rotenone (R), malonate (Ma), and antimycin A (AA), for consumption of O_2 with inhibited CTE. O_2 consumption rates were measured over time in minutes. The

fragments were homogenized in the BIOPS medium and evaluated in the MIR05 medium of compositions and tests described in materials and methods.

The only way to differentiate groups is by normalizing values by citrate synthase, because patients have more mitochondria than controls (figure 4).

Figure 4. Difference in O₂ consumption of control group and DM homogenates. The bar graphs show the medians and variances of the baseline O₂ consumption rates, energized and energized plus rotenone, already discounting the O₂ consumption values with the inhibited CTE. Statistical differences are indicated in the chart at * with $p = 0.01$ and ** with $p = 0.0061$ according to the Mann-Whitney test, $n = 7$ at the controls and $n = 4$ in the DM patients. The fragments were homogenized in the BIOPS medium and evaluated in MIR05 medium, compositions and assays described in materials and methods, in a total of eleven independent experiments.

Cytochrome C is indispensable for the analysis of O₂ flux, evidencing an improvement of the electron flow in ECT in more than 50% of the analyzed samples. It is interesting to note that in 2 control samples, rotenone did not have any inhibitory effect. We can attribute this to some problem in CI probably by freezing the sample. But malonate inhibited all samples, indicating that CII activity was preserved.

After energizing the medium with malate and acetyl CoA, both the CI and CII are available to carry electrons from NADH and FADH₂. By adding rotenone, only the CII pathway is available to transport the electrons, so the difference between these two means corresponds to the flux via CI. In both groups, the sum of medians from CI to CIV and CII to IVC flows was slightly higher than CI + CII to CIV. Although the median ICF flow to the IVC is higher in the control group, there is no statistical difference, since the minimum values are very close to the DM group. Due to this instability, we discarded this parameter for the evaluation of ETC in patients in the IE group.

4- Correlation test between the activity of the CTE complexes and the enzymatic activity of the complexes of CTE and citrate synthase.

The ETC activities, obtained by calculating the O₂ consumption, and the activities of each ETC complex individually analyzed correlated positively with a correlation coefficient greater than 0.50 (table 2), representing an increasing function.

Table 2. Correlation between O₂ consumption and enzymatic assays of the individual complexes of CTE and citrate synthase

		CS	CI	CII	CII + CIII	CIII	CIV
CII to CIV	ρ	-0,525**	0,527**	0,564**	0,431*	0,56**	0,743**
	p	0,008	0,008	0,005	0,035	0,004	0
	n	24	24	24	24	24	24
CI+CII to CIV	ρ	-0,725**	0,511*	0,707**	0,07	0,553**	0,632**
	p	0	0,011	0	0,745	0,005	0,001
	n	24	24	24	24	24	24

ρ = Correlation coefficient; p = level of significance; n = number of individuals

As the enzymatic activity of CII + CIII reflects, in addition to the activity of complexes II and III, the levels of coenzyme Q reduced in the CII and oxidized in the CIII, there was only correlation with the O₂ consumption of the CII to the VIC. The correlation of the CTE complexes with the CS activity was of intensity greater than 0.50 and negative, representing a decreasing function.

The observed correlations are of moderate to high magnitude indicating that the two experiments measure similar phenomena. Thus, the correlation test validates the O₂ consumption experiment in the frozen samples.

DISCUSSION

The investigation of a patient with suspected defect in CTE requires a combination of clinical, morphological, biochemical and genetic studies (BIRCH-MACHIN et al, 1994). In the biochemical study, in addition to the activity of the ETC complexes analyzed in isolation by spectrophotometer, we investigated a means to measure CTE activity by O₂ consumption via a high resolution electrode.

The experiments of O₂ consumption in frozen biopsies and homogenized by Turrax type equipment, which homogenizes the tissue through the fragmentation, unlike the Potter homogenizer, which homogenizes by crushing. We observed that the presence of non-homogenized tissue, especially the conjunctiva, results in a trace with, practically, no response to the added substrate or inhibitor, presenting a lot of noise throughout the experiment.

The BIOPS and CPT homogenization media were tested by analyzing the time interval in which the viability of the samples is maintained when kept in an ice bath. This factor is important because the sample processing laboratory is not always the same at which the sample will be analyzed, and storage and transport of the homogenate is necessary. The BIOPS medium preserved the sample better, probably because it contained the 2- (N-Morpholino) ethanesulfonic acid potassium

salt (KMES) buffer with pKa of 6.1 (250C), having a pH buffer range of 5.5 to 6.7; contains dithiothreitol (DTT), which is a reducing agent that protects free -SH groups from oxidation in the homogenization procedure, and ATP + PCr as sources of chemical energy. In contrast, the CPT medium has only the TRIS-HCl buffer to protect the sample, having pKa = 6.5 (250C) with buffering range similar to the BIOPS KMES buffer.

As freezing is not a standard procedure for O₂ consumption experiments, we initially analyzed the response of a fresh muscle homogenate fragment from two control individuals compared to the frozen individual fragment collected in the same muscle biopsy procedure. The ultrastructure of the homogenates shows that the freeze-thaw and sample homogenization procedures create cracks in the mitochondrial membranes, exposing their enzymes to the substrates. This may explain the response to acetyl CoA observed in homogenates derived from frozen samples, not observed in homogenates derived from fresh samples. These data are in accordance with the study by Birch-Machin et al. (1994), who evaluated several methods of membrane rupture, concluding that freezing-thawing of mitochondria is a crucial procedure in the quantification of ETC enzyme activity and CS. Although the ultrastructural analysis showed rupture of the mitochondrial membranes, it was not designed to quantitatively analyze this alteration. Even with the observation of relatively intact mitochondria, that is, with ruptures in their membranes but still maintaining a structuration that allows us to recognize the organelle, it is not possible to say in what proportion this degree of preservation occurred. Additional experiments will be needed to determine variabilities in this process and its influence on O₂ consumption results.

Cytochrome c should be part of the pool of substrates when it is intended to analyze samples homogenized by high resolution respirometry. Virtually all of our samples responded to their addition with an increase in the rate of O₂ consumption, including in the sample obtained from fresh tissue, indicating its loss in the homogenization procedure. This increase is notably greater in the samples from the DM group, which have defective mitochondria, which may reflect a deficiency of this component related to the disease. NAD⁺, in addition to being a positive effector for Krebs cycle enzymes, may prevent the metabolic pathway from being diverted to other dehydrogenase enzymes.

The traces, when normalized by wet weight, do not present significant difference between the groups, since the mitochondrial proliferation observed in the patients partially compensates for the deficiency of O₂ consumption. However, the protocol developed has a sensitivity to differentiate individuals with mitochondriopathies from normal individuals, when we corrected O₂ consumption rates by CS of each sample. The possibility of correcting O₂ consumption values by a parameter representing the mitochondrial mass, as in the case of CS, has an additional advantage to the method that uses the tissue homogenates, since individuals with mitochondrial disease may present intense proliferation of this organelle (Sobreira et al., 1997). The CS activities of patients in the DM group of the present study confirm the importance of adequate correction of O₂ consumption rate values, as well as other parameters of CTE function.

The rotenone insensitivity of samples from two individuals in the control group suggests that there was a compromise of the transfer of electrons from C_i to C_{III}, or a shift of NADH to other dehydrogenase enzymes. Since the enzymatic activity of the two individuals was normal, the detection of C_I dysfunctions by this method may be difficult, and confirmation by other methods is necessary. Even with this C_I instability,

the method was able to differentiate patients with mitochondrial disease from controls.

CONCLUSION

The protocol developed for the evaluation of CTE enzymatic complexes by high resolution respirometry (O₂ consumption without coupling of oxidative phosphorylation), from homogenates of previously frozen skeletal muscle biopsies is reproducible when analyzed from CII to CIV, and reliable in the study of mitochondrial function since it was analyzed in conjunction with other diagnostic exams

REFERENCES

- Bonilla E, Sciacco M, Tanji K, Sparaco M, Petruzzella V, Moraes, CT (1992) New morphological approaches to the study of mitochondrial encephalomyopathies. *Brain Pathol.* 2:113-119
- DiMauro S, Servidei S, Zeviani M, DiRocco M, DeVivo DC, DiDonato S, Uziel G, Berry K, Hoganson G, Johnsen SD (1987) Cytochrome c oxidase deficiency in Leigh syndrome. *Ann Neurol* 22: 498- 506
- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts *Nature Protocols* 2: 287-295
- Gellerich FN, Deschauer M, Chen Y, Müller T, Neudecker S, Zierz S (2002) Mitochondrial respiratory rates and activities of respiratory chain complexes correlate linearly with heteroplasmy of deleted mtDNA without threshold and independently of deletion size. *Biochimica et Biophysica Acta* 1556: 41-52
- Gellerich FN, Mayr JA, Reuter S, Sperl W, Zierz S (2004) The problem of interlab variation in methods for mitochondrial disease diagnosis: enzymatic measurement of respiratory chain complexes. *Mitochondrion* 4: 427-439
- Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Taylor RW, Turnbull DM, McFarland R (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol.* 77(5):753-9
- Gross VS, Greenberg HK, Baranov SV, Carlson GM, Stavrovskaya IG, Lazarev AV, Kristal BS (2011) Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization, *Anal. Biochem.* 418: 213–223
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS (2008) Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells *Nature Protocols* 3, 965 - 976
- Lanza IR, Sreekumaran N (2009) Functional Assessment of Isolated Mitochondria *In Vitro*. *Methods Enzymol.* 457: 349–372

Larsen S, Wright-Paradis C, Gnaiger E, Helge JW, Boushel R (2012) Cryopreservation of human skeletal muscle impairs mitochondrial function. *CryoLetters* 33 (3): 169-175

Lowry OH, Rosebroough NJ, Farr AC, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem*, 193: 265-275

Medja F, Allouche S, Frachon P, Jardel C, Malgat M, Mousson de Camaret B, Slama A, Lunardi J, Mazat JP, Lombès A (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9: 331-339

Rasmussen UF, Krustup P, Kjaer M, Rasmussen HN (2003) Experimental evidence against the mitochondrial theory of aging. A study of isolated human skeletal muscle mitochondria. *Experimental Gerontology* 38: 877-886

Rodenburg RJT (2011) Biochemical diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis* 34: 283-292

Schneider WC (1948) Intracellular distribution of enzymes; the oxidation of octanoic acid by rat liver fractions. *J Biol Chem* 66: 176-259

Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Ermani M, Salvati L, Angelini C (2011) Optimization of respiratory chain enzymatic assays in muscle for the diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* 11: 893-904

Thorburn DR, Chow CW, Kirby DM (2004) Respiratory chain enzyme analysis in muscle and liver. *Mitochondrion* 4: 363-375

Tonkonogi M, Harris B, Sahlin K (1998) Mitochondrial oxidative function in human saponin-skinned muscle fibres: effects of prolonged exercise. *Journal of Physiology* 510 (1): 279-286

Veksler VI, Kuznetsov AV, Sharov VG, Kapelko VI, Saks VA (1987) Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochimica et Biophysica Acta* 892: 191-196