

## Défice do Complexo da Piruvato Desidrogenase (cPDH): Primeiro Caso Identificado em Portugal

MARIA JOÃO SILVA 1, AGUINALDO CABRAL 2, FILOMENA EUSÉBIO 2, TERESA TASSO 2, ANA GASPAR 2,  
ISABEL TAVARES DE ALMEIDA 1, ISABEL RIVERA 1

<sup>1</sup> Unidade de Biologia Molecular e Biopatologia Experimental, Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Lisboa, Lisboa, <sup>2</sup> Unidade de Doenças Metabólicas, Hospital de Santa Maria, Lisboa

### Resumo

O Complexo da Piruvato Desidrogenase (cPDH) constitui um sistema multienzimático, localizado na matriz mitocondrial, que desempenha uma função crucial no metabolismo energético celular ao catalisar, de modo irreversível, a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-Coenzima A, substrato essencial do ciclo de Krebs. O cPDH é composto por seis subunidades: três componentes catalíticos (Piruvato descarboxilase ou E<sub>1</sub> – constituído por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ , di-hidrolipoamida transacetilase ou E<sub>2</sub>, di-hidrolipoamida desidrogenase ou E<sub>3</sub>), uma proteína de ligação à di-hidrolipoamida desidrogenase (E<sub>3</sub>BP ou Proteína X) e duas enzimas reguladoras (PDH-fosfatase e PDH-cinase), que controlam, por um mecanismo de desfosforilação/fosforilação, a actividade da subunidade E<sub>1</sub>. O défice do cPDH representa uma importante causa de doença hereditária do metabolismo intermediário, associado às hiperlactacidémias de origem mitocondrial e afectando principalmente o sistema neuro-encefálico. A maioria dos défices do cPDH envolve a subunidade E<sub>1</sub> $\alpha$ , cujo gene, *PDHA1*, se localiza no braço curto do cromossoma X (Xp22.1), se estrutura em 11 exões e ocupa cerca de 17 Kb de DNA genómico. Esta subunidade é de particular interesse visto conter o local de ligação do cofactor, pirofosfato de tiamina, bem como o local de fosforilação através do qual a actividade global do Complexo é regulada.

O presente trabalho refere o estudo de uma criança Portuguesa do sexo feminino, filha de pais saudáveis não consaguíneos, cujos dados clínicos e bioquímicos, bem como a determinação da actividade enzimática, eram compatíveis com um défice do cPDH. Apesar da caracterização proteica por Western-blot não ter revelado qualquer alteração ao perfil considerado normal, procedeu-se à caracterização molecular da subunidade E<sub>1</sub> $\alpha$ . A análise molecular realizada em cDNA e DNA genómico revelou a presença da mutação R378H, que conduz à troca de uma arginina por uma histidina na proteína resultante. Este estudo corresponde ao primeiro caso de uma mutação no gene *PDHA1* identificada num doente em Portugal.

**Palavras-Chave:** Acidose Láctica Congénita, Complexo da Piruvato Desidrogenase, Deficiência na subunidade E<sub>1</sub> $\alpha$ .

### Summary

#### The Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDHc) First Case Identified in Portugal

The Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDHc) is an intramitochondrial multienzyme complex, which play a key role in aerobic energy metabolism, catalysing the oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA. The catalytic activity of the complex is maintained by six components: three catalytic subunits (Pyruvate decarboxylase or E<sub>1</sub> – constituted by two  $\alpha$  and two  $\beta$  chains, Dihydro-lipoamide transacetylase or E<sub>2</sub>, Dihydro-lipoamide dehydrogenase or E<sub>3</sub>), a structural protein that serves as an E<sub>3</sub> binding protein (E<sub>3</sub>BP or Protein X) and two regulatory enzymes (PDH-phosphatase and PDH-kinase) that control the inactivation/activation of the Complex by a phosphorylation/dephosphorylation mechanism of the E<sub>1</sub> component. Inborn errors of PDHc are associated with clinical manifestations of lactic acidosis, neuroanatomic lesions, ataxia and developmental delay. The majority of PDHc deficiencies involve the E<sub>1</sub> subunit, the first catalytic component of the Complex, which gene, *PDHA1*, has been mapped on X chromosome (Xp22.1), contains 11 exons and spans approximately 17 Kb. This subunit is of particular interest since it contains the thiamine pyrophosphate binding site, as well the phosphorylation site through which the activity of the whole complex is regulated.

The present report refers to the study of a Portuguese girl, single daughter of unrelated parents, in whom clinical, biochemical and enzymatic evaluation were compatible with the presence of PDHc deficiency. In spite of the normal amounts of all subunits revealed on Western blotting analysis, the molecular approach of the E<sub>1</sub> gene was achieved. Mutation analysis performed at cDNA and genomic DNA levels revealed an arginine to histidine substitution at amino acid position 378 (R378H); this was the first case of PDHc E<sub>1</sub> subunit deficiency reported in Portugal.

**Key-Words:** Congenital Lactic Acidosis, Pyruvate Dehydrogenase Complex, E<sub>1</sub> $\alpha$  subunit deficiency.

## Introdução

O Complexo da Piruvato Desidrogenase (cPDH) constitui um sistema multienzimático, localizado na matriz mitocondrial, que desempenha uma função crucial no metabolismo energético celular ao catalisar, de modo irreversível, a descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-Coenzima A, substrato essencial do ciclo de Krebs<sup>(1)</sup>.

O cPDH é constituído por uma macromolécula de cerca de  $9,0 \times 10^3$  kDa e composto por seis subunidades: três componentes catalíticos (Piruvato descarboxilase ou E<sub>1</sub>, - constituído por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  -, di-hidrolipoamida transacetilase ou E<sub>2</sub>, di-hidrolipoamida desidrogenase ou E<sub>3</sub>), uma proteína de ligação à di-hidrolipoamida desidrogenase (E<sub>2</sub>BP ou Proteína X) e duas enzimas reguladoras (PDH-fosfatase e PDH-cinase) que controlam, por um mecanismo de desfosforilação/fosforilação, a actividade da subunidade E1<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>.

O cPDH encontra-se presente em todos os tecidos, sendo todas as suas subunidades codificadas pelo DNA nuclear e transportadas para o interior da mitocôndria<sup>(5,6)</sup>.

O défice do cPDH representa uma importante causa de doença hereditária do metabolismo intermediário, associada às hiperlactacidémias de origem mitocondrial, afectando principalmente o sistema neuro-encefálico.

A maioria dos fenótipos clínicos resultantes de uma actividade enzimática deficiente do cPDH tem sido atribuída a mutações localizadas nos genes que codificam para as subunidades E<sub>1</sub> $\alpha$ , E<sub>2</sub> e Proteína X. Contudo, é a subunidade E1 a responsável pelo maior número de casos até agora descritos, verificando-se uma heterogeneidade genética muito acentuada, em que as mutações caracterizadas (cerca de 76) ocorrem de forma esporádica e na maioria das vezes sob a forma "de novo"<sup>(6)</sup>.

Embora estas mutações possam intervir a nível do RNA, é provável que muitas se manifestem alterando as propriedades da proteína E<sub>1</sub> $\alpha$ , nomeadamente no que se refere à sua interacção com os outros elementos do cPDH. Essas alterações podem incluir incapacidade de: 1) *folding* ou estabilidade da E<sub>1</sub> $\alpha$ ; 2) transporte da subunidade E<sub>1</sub> $\alpha$  para o interior da mitocôndria e/ou o seu correcto processamento neste organelo; 3) associação da E<sub>1</sub> $\alpha$  com os outros componentes constituintes do Complexo; 4) catálise ou ligação de substratos ou cofactores pelo tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$ ; ou 5) regulação da E<sub>1</sub> através do mecanismo de fosforilação / desfosforilação. Para cada uma das mutações identificadas, o conhecimento das alterações provocadas pode ser muito útil na definição da estratégia terapêutica a aplicar<sup>(7)</sup>.

A subunidade E<sub>1</sub> $\alpha$  existe, no homem, sob a forma de duas isoenzimas codificadas por dois genes distintos: *PDHA1* e *PDHA2*. O gene *PDHA1* localiza-se no braço curto do cromossoma X (Xp22.1) e apresenta expressão nas células somáticas; o gene *PDHA2* situa-se no braço

longo do cromossoma 4 (4q22-23) e exprime-se selectivamente nas células testiculares em fase pós-meiótica. O gene *PDHA1* cobre cerca de 17 kilobase (Kb) de DNA genómico e estrutura-se em 11 exões separados por 10 intrões. O gene *PDHA2* cobre aproximadamente 1,4 Kb de DNA genómico e não apresenta intrões<sup>(8,9)</sup>.

O presente estudo permitiu a identificação, em Portugal, do primeiro caso de défice no Complexo da Piruvato Desidrogenase, através dos ensaios bioquímicos efectuados, nomeadamente, a determinação da actividade enzimática em linfócitos e fibroblastos, bem como o estudo proteico das subunidades constituintes pela técnica de Western-blot. Posteriormente, a diminuição de actividade do Complexo, que se verificou estar presente nos dois tipos de material biológico, foi confirmada ao procedermos à identificação da mutação R378H no gene *PDHA1*, a primeira descrita em Portugal, sendo esta mutação, tanto quanto se sabe, o segundo caso presente numa criança do sexo feminino de entre os oito identificados a nível mundial.

## Material e Métodos

### Caso Estudado

ARRV é uma jovem do sexo feminino, nascida a 03/11/83 e filha de pais saudáveis não consanguíneos. A gravidez foi de termo e decorreu sem problemas, tendo o parto sido de cesariana devido a placenta prévia após duas volumosas hemorragias. O seu desenvolvimento psicomotor caracterizou-se sempre por aquisições tardias: controlo cefálico aos 2A, sentar aos 2A, primeiras palavras aos 2,5A e primeiras frases simples após os 4A. Progressivamente foi-se acentuando uma cifoescoliose e luxação bilateral da anca, bem como um afilamento dos membros inferiores com atrofia distal; os ROT foram sempre muito vivos, com área reflexogénea aumentada e clonos; apresentava, ainda, microcefalia, hipertrofia gengival e períodos de hiperpneia especialmente em momentos de stress.

Foi rotulada de paralisia cerebral por anóxia neonatal, até que aos 6A foi internada no Hospital de Sta. Maria (Lisboa) por prostração grave e convulsões no contexto de intercorrência febril prolongada. Os estudos efectuados revelaram: imagens de enfarte nos núcleos de base (TACC-E), valores aumentados de ácido láctico no sangue, urina e LCR, bem como de alanina plasmática; a presença concomitante de acidose metabólica levou ao diagnóstico de Doença de Leigh. O facto da relação L/P ter sido sempre normal levantou a hipótese de se tratar de um défice do Complexo da Piruvato Desidrogenase (cPDH), a qual foi confirmada pelos estudos bioquímicos, enzimáticos (linfócitos e fibroblastos) e moleculares.

Teve menarca aos 16 anos. Actualmente mantém bom

contacto social, cifoescoliose e tetraplegia espástica com contractura evidente dos joelhos e cotovelos. Mantém terapêutica com tiamina e bicarbonato de sódio.

### Preparação de material biológico

**Fibroblastos e linfócitos** - a cultura de fibroblastos, obtida de biópsia de pele retirada da parte interna do antebraço, foi efectuada em *Dulbecco's Eagle Medium* suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de vitelo, de acordo com o método descrito por Robinson BH<sup>(10)</sup>. As células foram incubadas com 5 mM de ácido dicloroacético a 37° C durante 15 min e sofreram três ciclos de congelação/descongelação imediatamente antes do ensaio que determina a actividade do Complexo. Os linfócitos, obtidos de sangue periférico heparinizado, foram preparados à temperatura ambiente em gradiente de Ficoll-Paque, como descrito por Bøyum A<sup>(11)</sup>, com duas horas de intervalo máximo entre a colheita e a sua obtenção. A totalidade das células retiradas da interface do gradiente de densidade de Ficoll foram lavadas duas vezes com solução de Hank's. O precipitado final de linfócitos foi ressuscitado em 1 mL de uma solução constituída por 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 2 mM EDTA e 1 mM DTT tendo sido sonicadas imediatamente antes ao processamento para doseamento da actividade enzimática do Complexo.

### Análise bioquímica

**Determinação da actividade enzimática do cPDH** - a determinação da actividade do complexo da PDH foi efectuada de acordo com o método descrito por Seals *et al*<sup>(12)</sup> e posteriormente modificado por Clot *et al*<sup>(13)</sup>, o qual se baseia na libertação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de piruvato marcado em  $\alpha$  com carbono 14. Os linfócitos e os fibroblastos obtidos foram previamente sujeitos a uma pré-incubação numa mistura contendo 1,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,96 mM DTT e 75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, durante 10 min a 37° C, de forma a assegurar a activação plena do complexo enzimático.

**Análise dos constituintes proteicos por Western-blot** - fibroblastos do paciente e de uma testemunha foram sujeitos a uma electroforese em gel descontínuo desidratante de SDS/poliacrilamida a 10% (p/v) (SDS/PAGE), de acordo com o descrito por Laemmli<sup>(14)</sup>. As proteínas foram, posteriormente, electrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 microns, sob uma intensidade de corrente de 100 mA / 90 min, à temperatura ambiente em 25 mM Tris/HCl, pH 8,2-8,7 contendo 192 mM glicina e 20% (v/v) de metanol<sup>(15)</sup>. A membrana foi incubada (c.a. de 12 h), a 4° C, com o anti-corpo anti-cPDH total, o qual foi previamente diluído (1/2000) com tampão TBS contendo 1% (p/v) albumina sérica bovina isenta de ácidos gordos e 0,5% (v/v) Tween 20. Após

lavagem extensiva, a membrana foi incubada durante 1h, com peroxidase de cavalo associada a uma imunoglobulina G anti-coelho diluída a 1/1000. Os imunocomplexos formados foram detectados através do "ECL™ Western blotting protocols", da Amersham Life Science.

### Análise molecular

**Obtenção de RNA, cDNA e DNA genómico** - As células (linfócitos ou fibroblastos) foram lisadas por adição de 350  $\mu$ L da solução de lise (50mM Tris-HCl pH 8,8, 140mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,5% Nonidet P-40) e centrifugadas a 1200 rpm/2 min/4 °C e o sobrenadante obtido foi utilizado para a preparação do RNA total de acordo com as especificações descritas no "RNeasy Mini Kit" (Qiagen). A preparação do cDNA foi efectuada a partir de 1-5  $\mu$ g de RNA total de acordo com as especificações incluídas no "First-Strand cDNA Synthesis Kit" (Amersham Pharmacia Biotech). O DNA genómico foi isolado do núcleo das células sanguíneas utilizando a conjugação dos métodos de Leadon e Cerutti<sup>(16)</sup> e Miller *et al*<sup>(17)</sup>. Por seu lado, os fibroblastos foram ressuscitados em 700  $\mu$ L de tampão STE (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl e 1mM EDTA pH 8,0) a que se adicionaram 35  $\mu$ L de uma solução 10% SDS e 7  $\mu$ L de uma solução 20mg/mL Proteinase K. Seguiu-se uma incubação de 55°C durante a noite, com agitação suave tendo o DNA sido, posteriormente, isolado através da extracção com a mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

**Amplificação *in vitro* do cDNA e DNA genómico do gene PDHA1** - O cDNA foi amplificado em seis fragmentos sobreponíveis de acordo com o método descrito por

**Tabela I**  
Sequência nucleotídica dos primers utilizados no estudo do cDNA da subunidade E<sub>1</sub> $\alpha$  (PDHA1)

Frag.A	PDS1	5' - TGT GAG GAG TCG CCG CTG CC - 3'
	PDS2	5' - CAC AAG TGA CAG AAA CCA CG - 3'
Frag.B	PDS7	5' - AGA CTG TAC GCC GAA TGG AG - 3'
	PDS8	5' - AGG CTA GAG CAA TCC CAG CG - 3'
Frag.C	PDH34	5' - AGA ACT TCT ACG GGG GCA ATG G - 3'
	PDH31	5' - AGG ATA TCC ATT CCA TCC AC - 3'
Frag.D	PDH30	5' - TGG CGA TGG TGC TGC TAA CC - 3'
	PDH32	5' - GGT AAG TCT GCA GCT CCA TC - 3'
Frag.E	PDS3	5' - AGT GGA TGG AAT GGA TAT CC - 3'
	PDS4	5' - TTT AGT TCT TCC ACA CTG GC - 3'
Frag.F	PDS5	5' - TAA GAG TGA CCC TAT TAT GC - 3'
	PDS6	5' - GTC TGG TAG CCC CCT GAA GG - 3'

Lissens *et al*<sup>(18)</sup>. Os pares de *primers* utilizados na amplificação dos diversos fragmentos encontram-se descritos na tabela I. A reacção de PCR foi efectuada a partir de 30 µL de cDNA (diluído 1/6, v/v), na presença de mistura reaccional [10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 500 nM de cada *primer* e 0,8 U Taq DNA polimerase (Gibco-BRL)] num volume final de 50 µL. O programa de amplificação utilizado incluiu 1 ciclo de 94° C / 5 min, 55° C / 1 min, 72° C / 2 min; 35 ciclos a 94° C / 1 min, 55° C / 1 min, 72° C / 30 seg; o ciclo de elongação final ocorreu durante 7 minutos a 72° C. Para a amplificação do DNA genómico os pares de *primers* utilizados foram delineados com base nos *primers* previamente descritos por Matsuda *et al*<sup>(19)</sup> e por Otero *et al*<sup>(20)</sup>, os quais se apresentam na tabela II. A reacção de

**Tabela II**  
Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados no estudo do DNA genómico da subunidade E<sub>1</sub>α (PDHA1)

Exão 1	1F	5' - GCG CAG CGC ATG ACG TTA TTA CG - 3'
	1R	5' - CCG GCC AGC CCG GGA GGT CT - 3'
Exão 2	2F	5' - GCC AAA GCA TGG ATT CAT TT - 3'
	2R	5' - TCT GAA CTT CTG ATC CTG GAC A - 3'
Exão 3	3F	5' - CCA AGC CCC ATC TCA TTG - 3'
	3R	5' - ACA CAG TTC CAC CAC AAA CC - 3'
Exão 4	4F	5' - TTA TTG CTT CTG GTT TGG GC - 3'
	4R	5' - CCC CTT TCT GTA AAT CAA CAG C - 3'
Exão 5	5F	5' - TGG TTG AGC CTC AGA GTA CA - 3'
	5R	5' - TGG CTG TAC TAG CTT CAG GA - 3'
Exão 6	6F	5' - GAT TCT GGC CAG GAG TGA AA - 3'
	6R	5' - GGT7 GAG CTC CTTAC AGG AA - 3'
Exão 7	7F	5' - AGG AGG CCT TTC TGT GCT TT - 3'
	7R	5' - CGG CCC CAC CAC AGG GTT CCT - 3'
Exão 8	8F	5' - TGT CGC CCC TCC CCT GTT TAT - 3'
	8R	5' - CTT CCA TCT CAT GCA CCT CA - 3'
Exão 9	9F	5' - TGA GCC ACC ATC CTG GCC TT - 3'
	9R	5' - GCG TAC ATG AAG TGA ACT GG - 3'
Exão 10	10F	5' - ATT TCA CTC ATT GGG ACA TCC - 3'
	10R	5' - TGG TTC ACA GTC CAC CAA AA - 3'
Exão 11	11F	5' - TTT TGG TGG ACT GTG AAC CA - 3'
	11R	5' - GTC TGG TAG CCC CCT GAA GG - 3'

amplificação dos diversos exões, excepto o exão 9, e respectivas zonas intrónicas adjacentes, foi efectuada numa mistura reaccional de constituição equivalente àquela utilizada na amplificação do cDNA, adicionada de

0,05% de detergente w-1 e com uma concentração de MgCl<sub>2</sub> de 3,0 mM. A amplificação do exão 9 foi executada diminuindo a concentração do ião magnésio para 1,5 mM, mantendo-se as restantes proporções da mistura reaccional. Utilizaram-se dois programas de amplificação: o programa A, utilizado na reacção de amplificação de todos os exões com excepção dos exões 1 e 7, incluiu um ciclo de 94° C / 5 min, 58° C / 1 min, 72° C / 2 min; 30 ciclos a 92° C / 40 seg, 58° C / 40 seg, 72° C / 90 seg; o ciclo de elongação decorreu a 72° C durante 5 minutos; programa B diferiu do anterior, apenas, na temperatura de hibridação que ocorreu a 62° C, tendo sido utilizado na amplificação dos exões 1 e 7 do DNA genómico.

**Análise de polimorfismos de conformação de cadeia simples (SSCP)** - os seis fragmentos correspondentes à região codificante do gene *PDHA1*, bem como os 11 exões, incluindo as regiões intrónicas adjacentes do DNA genómico, foram avaliados por SSCP<sup>(21)</sup>. Com essa finalidade, recorreu-se a uma electroforese em gel a 8% de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) em tampão TBE contendo 5% de glicerol, tendo as amostras sido submetidas a uma intensidade de corrente constante (12,5 mA / gel) à temperatura ambiente, durante 18 h. Estas condições foram utilizadas na avaliação dos seis fragmentos do cDNA e dos exões 7, 9 e 11 do DNA genómico. Os restantes exões do gene *PDHA-1* foram submetidos a uma electroforese utilizando um gel de concentração de 12% e um tempo de migração de 24h. A visualização das bandas correspondentes foi efectuada por coloração com nitrato de prata, de acordo com a metodologia proposta pela Pharmacia Biotech.

**Determinação das sequências nucleotídicas por sequenciação directa** - os produtos de PCR em que se observou alteração do perfil de migração electroforética obtido por SSCP (fragmento F do cDNA e exão 11 do DNA genómico) foram sujeitos a sequenciação directa efectuada pelo método de Sanger, utilizando o protocolo incluído no kit "Sequenase version 2.0" da United States Biochemical. Cada produto de PCR foi sequenciado em ambos os sentidos, utilizando os respectivos *primers* de PCR.

**Tabela III**  
Dados da avaliação bioquímica e molecular

Lactato (mM)	Piruvato (mM)	/P	Actividade enzimática do cPDH % linfócitos	Actividade enzimática de cPDH % fibroblastos	Caracterização proteica por Western-blot	Caracterização molecular E <sub>1</sub> α
4,53	0,274	16,4	19	11	Sem alteração	R378H

## Resultados

Os dados bioquímicos e moleculares desta paciente encontram-se discriminados na tabela III. A determinação da actividade enzimática relativa revelou uma acentuada diminuição, quer quando avaliada em linfócitos (19%), quer em fibroblastos (11%). Face a estes resultados procedeu-se à caracterização proteica por Western-blot, a qual contudo não revelou qualquer alteração ao perfil considerado normal (Figura 1)

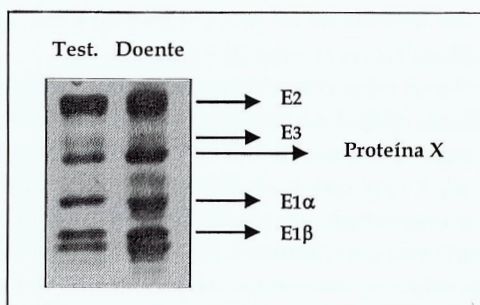


Fig. 1 - Perfis imunoelectroforéticos dos constituintes do cPDH obtidos a partir de homogeneizado de fibroblastos do doente em estudo (6,5 µg) e da testemunha (9,6 µg). A sua análise permite verificar que o perfil obtido se pode considerar normal.

A amplificação do cDNA em seis fragmentos sobreponíveis, bem como dos onze exões constituintes do gene *PDHA1* e a sua análise posterior por SSCP revelou alteração nos perfis de migração electroforética dos fragmento F do cDNA e do exão 11 do DNA genómico (Figura 2).

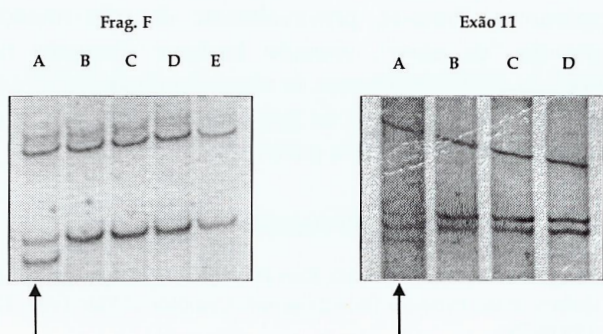


Fig. 2 - Análise por PCR-SSCP do cDNA e DNA genómico da subunidade E,α do cPDH da criança com suspeita de défice no Complexo (amostra A). Amostras B e C correspondem ao pai e à mãe, respectivamente, e as amostras D e E a controlos negativos. As setas indicam a alteração ao perfil electroforético normal: fragmento F e exão 11.

A sequenciação directa destas duas regiões (Figura 3 e 4) revelou a presença da mutação R378H, a qual corresponde à substituição no nucleótido 1176, segundo nucle

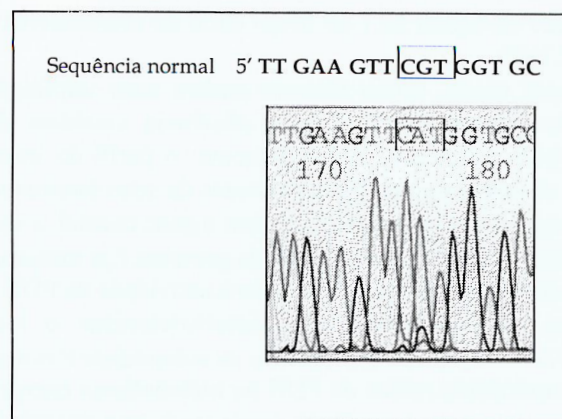


Fig. 3 - Identificação da mutação R378H através da sequenciação do fragmento F do cDNA da criança em estudo. Pode observar-se a substituição G→A no nucleótido 1176, correspondente ao códon 378.

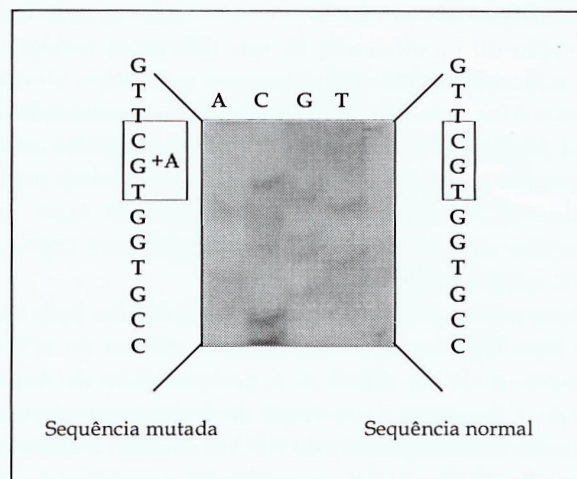


Fig. 4 - Identificação da mutação R378H através da sequenciação do exão 11 do gene *PDHA1* a partir do DNA genómico da criança em estudo. Visto tratar-se de um doente do sexo feminino apresenta simultaneamente o nucleótido mutado (adenosina) e o nucleótido normal (guanósina) no nucleótido 1176.

ótido do códon 378, de uma guanósina por uma adenosina (CGT →CAT), substituição esta que conduz à troca de uma arginina por uma histidina na proteína resultante.

## Discussão

O défice na subunidade E,α do Complexo da Piruvato Desidrogenase é um erro hereditário do metabolismo que apresenta, além de uma grande variabilidade clínica, uma considerável heterogeneidade bioquímica, com uma pobre correlação entre a severidade clínica e o nível de actividade residual. Uma base genética que permite explicar esta heterogeneidade tornou-se patente quando o gene que codifica para a forma somática da subunidade E,α foi clonado e

mapeado na região 22.1 do braço curto do cromossoma X (Xp22.1)<sup>(22)</sup>.

Deste modo, vários factores podem estar implicados na alteração da estabilidade e eficiência catalítica dos polipéptidos mutados, nomeadamente: o perfil de inactivação do cromossoma X em pacientes do sexo feminino, a proporção das células que exprimem o gene normal, a variabilidade tecidual de expressão da proteína E $\alpha$  mutada, a dependência do cérebro em relação à actividade da PDH (o sistema nervoso central é caracteristicamente o local primário de expressão dos defeitos da subunidade E $\alpha$  devido à importância crítica da PDH no metabolismo energético essencialmente dependente da glucose), as necessidades energéticas importantes para o desenvolvimento das estruturas a nível neurológico durante o período fetal e a severidade da mutação<sup>(22, 23, 24)</sup>.

No entanto, foi possível demonstrar que em indivíduos heterozigóticos do sexo feminino é a variação dos perfis de inactivação do cromossoma X, nos diferentes tecidos, o factor mais importante que determina o fenótipo clínico. Em casos extremos, em que a expressão do cromossoma X normal predomina nos tecidos periféricos, enquanto que o cromossoma X que apresenta a mutação se exprime preferencialmente no cérebro, torna-se impossível fazer um diagnóstico com bases nos ensaios bioquímicos executados nos tecidos periféricos<sup>(23)</sup>.

Deste modo, a identificação de mutações em indivíduos do sexo feminino, por sequenciação directa do cDNA respectivo, pode ser difícil se a probabilidade de inactivação do X favorecer a expressão do cromossoma normal, implicando a sub-expressão do RNAm do alelo mutado no tecido em estudo. Assim, a avaliação concomitante do cDNA e DNA genómico é o aconselhável, visto este último permitir a equitativa representação dos alelos dos dois cromossomas X<sup>(23)</sup>.

O presente estudo permitiu a identificação do primeiro caso de défice no cPDH, em Portugal. O seu diagnóstico foi estabelecido através da determinação da actividade enzimática do Complexo em linfócitos (19% de actividade em relação a um controlo processado paralelamente) e em fibroblastos (11% de actividade), estando os teores de lactato e piruvato, parâmetros bioquímicos orientadores, aumentados em relação aos valores considerados normais e a razão lactato / piruvato normal, facto compatível com um défice no cPDH.

A análise molecular realizada em cDNA e DNA genómico da paciente revelou a presença da mutação R378H, a qual corresponde à substituição no nucleótido 1176, de uma guanósina por uma adenosina (CGT→CAT), substituição esta que conduz à troca de uma arginina por uma histidina na proteína resultante.

A análise dos constituintes proteicos, efectuada através da técnica de Western-blot, não revelou qualquer alteração

ao perfil considerado normal, situação análoga à descrita por Chun *et al*<sup>(24)</sup> em relação ao único paciente do sexo feminino até agora identificado com a mesma mutação. No entanto, os pacientes do sexo masculino que apresentam a mutação R378H (com excepção do descrito por Chun *et al*<sup>(24)</sup>), revelaram ausência da banda correspondente à subunidade E $\alpha$ , sugerindo ou uma degradação rápida da proteína ou a não incorporação da subunidade mutada<sup>(25)</sup>.

A arginina afectada (Arg<sup>378</sup>) parece fazer parte de uma sequência altamente conservada, estando também presente numa posição semelhante no gene E $\alpha$  específico do tecido testicular humano - *PDHA2*. Por outro lado, pensa-se que ela pode ser importante no próprio *folding* e incorporação da subunidade E $\alpha$  no Complexo<sup>(25)</sup>.

No entanto estas considerações não permitem explicar de uma forma global os outros três casos apresentados (a paciente aqui referenciada e os dois doentes descritos por Chun *et al*,<sup>(24)</sup> em que a diminuição de actividade enzimática é acompanhada por um perfil electroforético obtido por Western-blot perfeitamente normal, sugerindo que outros mecanismos se encontram subjacentes ao défice revelado.

Esta foi a primeira mutação pontual descrita para o gene da subunidade E $\alpha$ <sup>(25)</sup>, tendo sido também a primeira mutação descrita nos dois sexos<sup>(24)</sup> e constitui presentemente a segunda mutação mais frequente responsável pelos défices do cPDH<sup>(6)</sup>.

Dada a natureza do défice na subunidade E $\alpha$  do Complexo e a severidade das mutações é pouco provável que os progenitores sejam portadores sem apresentarem sinais clínicos. Esta constatação é corroborada neste caso por estudos de segregação familiar efectuados e que não revelaram a presença da mutação em qualquer um dos progenitores. Trata-se, provavelmente de uma mutação ocorrendo "de novo", situação bastante frequente nos défices do cPDH resultantes de alteração no gene *PDHA1*, e que suporta a hipótese de que esta alteração é a causa mutacional do défice nesta paciente.

#### Bibliografia

1. Patel MS, Naik S, Wexler ID, Kerr DS. Gene regulation and genetic defects in the Pyruvate Dehydrogenase Complex. *J Nutr* 1995; **125**: 1753S-7S
2. Aral B, Benelli C, Ait-Ghezala G, Amessou M, Fouque F, Maunoury C, Créau N, Kamoun P, Marsac C. Mutations in PDX1, the human X-lipoyl-containing component of the Pyruvate Dehydrogenase Complex gene on chromosome 11p1, in congenital lactic acidosis. *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 1318-26
3. Rouillac C, Aral B, Fouque F, Marchant D, Saudubray J-M, Dumez Y, Lindsay G, Abitbol M, Dufier J-L, Marsac C, Benelli C. First prenatal diagnosis of defects in the *HsPDX1* gene encoding Protein X, an additional lipoyl-containing subunit of the human Pyruvate Dehydrogenase complex. *Prenat Diagn* 1999; **19**: 1160-64
4. Robinson BH. Lactic Acidemia: Disorders of Pyruvate Carboxylase and Pyruvate Dehydrogenase. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS,

- Valle D eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease 8<sup>th</sup> ed*, New York: McGraw-Hill Inc. 2001; **100**: 2275-95
5. Dahl H-HM, Brown GK, Brown RM, Hansen LL, Kerr DS, Wexler ID, Patel MS, Meirleir L de, Lissens W, Chun K, MacKay N, Robinson BH. Mutations and polymorphisms in the Pyruvate Dehydrogenase E<sub>1</sub>α gene. *Hum Mut* 1992; **1**: 97-102
  6. Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, Liebaers I, Brown GK, Brown RM, Ito M, Naito E, Kuroda Y, Kerr DS, Wexler ID, Patel MS, Robinson BH, Seyda A. Mutations in the X-linked Pyruvate Dehydrogenase (E<sub>1</sub>α) sub-unit (PDHA-1) in patients with a Pyruvate Dehydrogenase Complex deficiency. *Hum Mut* 2000; **15**: 209-19
  7. Wu Y-G, Widjaja SL, Huang C-Y, Li W, Nixon PF, and Duggleby RG. Congenital Lactic Acidosis: Evaluation of the properties of the A199T natural variant of human Pyruvate Dehydrogenase E<sub>1</sub>α by *in vitro* mutation. *Mol Genet Metab* 2001; **72**: 269-72
  8. Maragos C, Hutchison WM, Hayasaka K, Brown GK. Structural organization of the gene for the E<sub>1</sub>α sub-unit of the human Pyruvate Dehydrogenase Complex. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12294-8
  9. Dahl H-HM, Brown RM, Hutchison WM, Maragos C, Brown GK. A testis-specific form of the human Pyruvate Dehydrogenase E<sub>1</sub>α sub-unit is coded for by an intronless gene on chromosome 4. *Genomics* 1990; **8**: 225-32
  10. Robinson BH. Cell culture studies on patients with mitochondrial diseases: molecular defects in Pyruvate Dehydrogenase. *J Bioenerg Biomembranes* 1988; **20**: 313-23
  11. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J Clin Lab Invest* 1968; **97**: 77-89
  12. Seals JR, Jarett L. Activation of pyruvate dehydrogenase by direct addition of insulin to an isolated plasma membrane/mitochondria mixture evidence for generation of insulin's second messenger in a subcellular system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 77-81
  13. Clot JP, Benelli C, de Gallé B, Postel-Vinay MC, Durand D, Debuquois B. Effects of growth hormone on Pyruvate Dehydrogenase activity in intact rat liver and in isolated hepatocytes: comparison with insulin. *Metabolism* 1988; **37**: 1101-06
  14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-5
  15. Towbin H, Staehli and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 4350-54
  16. Leadon SA, Cerutti PA. A rapid and mild procedure for the isolation of DNA from mammalian cells. *Anal Biochem* 1982; **120**: 282-8
  17. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988; **16**: 1215
  18. Lissens W, De Meirleir L, Seneca S, Benelli C, Marsac C, Poll-The BT, Briones P, Ruitenbeek W, van Diggelen O, Chaigne D, Ramaekers V, Liebaers I. Mutation analysis of the Pyruvate Dehydrogenase E1 gene in eight patients with a Pyruvate Dehydrogenase Complex deficiency. *Hum Mut* 1996; **7**: 46-51
  19. Matsuda J, Ito M, Naito E, Yokota Y, Kuroda Y. DNA diagnosis of Pyruvate Dehydrogenase deficiency in female patients with congenital lactic acidemia. *J Inher Metab Dis* 1995; **18**: 534-46
  20. Otero LJ, Brown RM, Brown GK. Arginine 302 mutations in the Pyruvate Dehydrogenase E1 subunit gene: identification of further patients and *in vitro* demonstration of pathogenicity. *Hum Mut* 1998; **12**: 114-21
  21. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2766-70
  22. Dahl H-HM, Hansen LL, Brown RM, Danks DM, Rogers JG and Brown GK. X-linked Pyruvate Dehydrogenase E1 subunit deficiency in heterozygous females: variable manifestation of the same mutation. *J Inher Metab Dis* 1992; **15**: 835-47
  23. Matthews PM, Brown RM, Otero LJ, Marchington DR, LeGris M, Howes R, Meadows LS, Shevell M, Scriver CR, Brown GK. Pyruvate Dehydrogenase Deficiency, clinical presentation and molecular genetic characterization of five new patients. *Brain* 1994; **117**: 435-43
  24. Chun K, MacKay N, Petrova-Benedict R, Federico A, Fois A, Cole DEC, Robertson E and Robinson BH. Mutations in the X-linked E1 subunit of Pyruvate Dehydrogenase: exon skipping, insertion of duplicate sequence, and missense mutations leading to the deficiency of the Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 558-69
  25. Hansen LL, Brown GK, Kirby DM and Dahl H-HM. Characterisation of the mutations in three patients with Pyruvate Dehydrogenase E<sub>1</sub>α deficiency. *J Inher Metab Dis* 1991; **14**: 140-51