

# INSTABILIDADE GENÔMICA DO mtDNA E O PROCESSO DE ENVELHECIMENTO EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*).

Sagica FES (SAMAM/IEC-PA), Alencar DO (UFPA-PA), Calcagno DQ (UFPA-PA), Seabra AD (UFPA-PA), Santos AKR (UFPA-PA), Burbano R (UFPA-PA)

## INTRODUÇÃO

Alterações no mtDNA afetam funções da cadeia respiratória, desregulando o mecanismo de proteção exercido por esta e aumentando a produção de radicais livres, o que pode provocar o aparecimento de características associadas ao envelhecimento. O estresse mitocondrial crônico presente no envelhecimento afeta a resposta genética podendo levar a instabilidade genômica observada na idade avançada, com a presença de mutações na molécula de mtDNA.

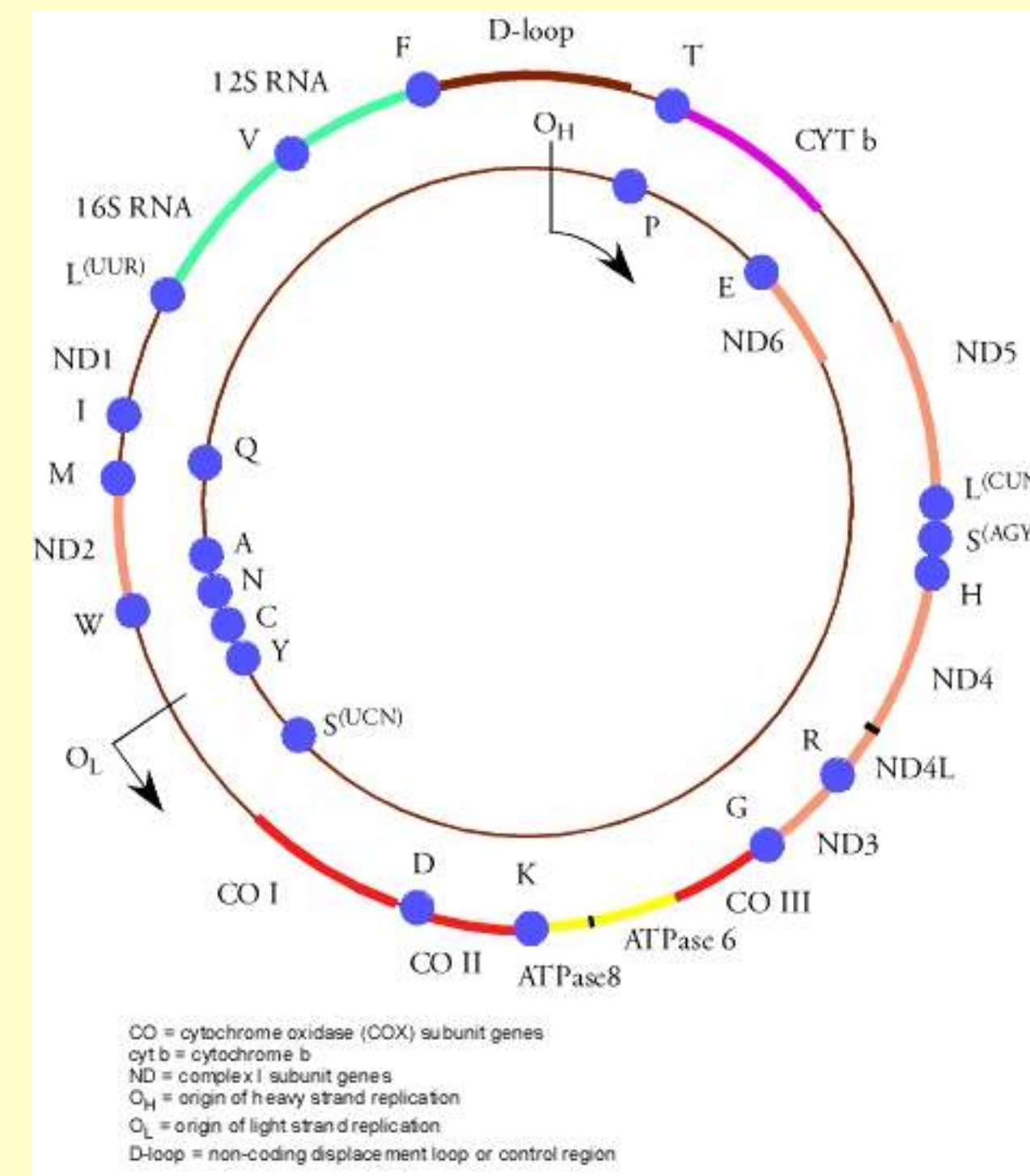


Figura 1: Mapa colorido do DNA mitocondrial

## OBJETIVO

Com o objetivo principal de investigar as bases moleculares mitocondriais das doenças neurodegenerativas crônicas, foram investigados fatores de risco, como alterações nutricionais perinatais e hábitos de atividade física em relação à presença ou não de mutações mitocondriais nesses indivíduos. Para tal foram comparados, em nível temporal, o surgimento ou não de mutações mitocondriais, bem como os tipos de alterações, que poderiam estar associadas ao estresse mitocondrial e ao possível efeito genotóxico na estrutura e na expressão da molécula de mtDNA.

## METODOLOGIA

No presente trabalho foi investigada a instabilidade genômica mitocondrial (região D-Loop) de 15 indivíduos fêmeas *Mus musculus*, da linhagem C57BL/6.

### -Grupos:

Controle jovem (CJ - gaiolas padrão com seis meses de idade);

Ambiente enriquecido jovem (AEJ - gaiolas com ambiente enriquecido e seis meses de idade);

Ambiente enriquecido senil (AES - gaiolas com ambiente enriquecido e 22 meses de idade).

### -Extração do DNA:

A obtenção do material biológico foi realizada através de punção venosa, onde foi retirado 500 µL de sangue, antes do início do tratamento, sendo que a extração do DNA foi realizada pelo método com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol [Sambrook et al., 1989]. A presença do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo SYBER Green.

### -Amplificação pela PCR e seqüenciamento:

A região D-loop do mtDNA das amostras foi amplificada pela técnica de PCR, utilizando dois iniciadores específicos de DNA, escolhidos a partir da sequência descrita no Gene-Bank para o locus NC-005089 da espécie *Mus musculus*:

P15.361 F = 5'-3': AAGAAGGAGCTACTCCCCAC

P40 R = 5'-3': GCATTTTCAGTGCTTTGCTTTG

## RESULTADOS

Os resultados obtidos no sequenciamento do mtDNA mostraram a presença de 10 mutações nos três grupos:

Tabela 1. Mutações encontradas nos indivíduos.

Indivíduo	Identificação	Mutações									
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		5	5	5	5	5	6	6	6	6	6
		4	9	5	9	9	0	0	0	0	0
		0	6	8	9	9	0	3	4	6	6
		5	2	6	3	6	5	7	0	3	3
		T	A	A	A	A	T	T	T	T	C
1	R1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	R2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	R3	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	R4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	R5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	R6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	R7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	CJ 02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		HETER			A/G						
9	CJ 03	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	AEJ 02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	AEJ 03	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	AEJ 04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	AES 02	.	.	.	i	.	.	.	i	.	i
14	AES 04	.	*	.	.	.	i	i	.	.	.
15	AES 04 II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	i

A: substituição de timina por adenina; \*: deleção; i: inserção; HETER A/G: heterozigoto.

Uma mutação de ponto em um indivíduo CJ; Duas mutações do tipo deleção em dois indivíduos AE, um indivíduo jovem e outro senil; Seis mutações do tipo inserção em três indivíduos AES. O grupo CJ foi considerado de baixo risco, por apresentar uma mutação de ponto. Ao comparar a proporção de mutações entre os grupos de baixo (CJ) e alto risco (AEJ e AES), observa-se diferença estatística significativa (P<0.05). Todos os indivíduos do grupo AES apresentaram mutações, o que contrastou com os resultados observados no grupo CJ (P<0.001). Ao comparar a frequência de eventos mutacionais entre indivíduos AEJ e AES, observa-se diferença altamente significativa (P<0.001). A mutação do tipo inserção se restringiu ao grupo AES, e a mutação do tipo deleção estava distribuída entre um indivíduo jovem (AEJ) e outro senil (AES).

## CONCLUSÃO

Um dos principais fatores que contribuem para esta possível instabilidade seria o fato de que o mtDNA está localizado na organela que produz a maior quantidade de radicais livres dentro da célula, além de estar associado a poucas histonas e apresentar baixa atividade de reparo, o que o deixaria desprotegido. Sendo assim, o acúmulo de mutações parece estar mais associado à idade cronológica do que ao ambiente a que os indivíduos foram expostos.

Estes achados sugerem que, independente da presença do ambiente enriquecido, o grupo Senil apresenta maior instabilidade genômica mitocondrial.