



MARCELA SCABELLO AMARAL FERNANDES

**“ANÁLISE COMPARATIVA CLÍNICA E MOLECULAR DA  
NEUROPATIA ÓPTICA HEREDITÁRIA DE LEBER (LHON)”**

**CAMPINAS  
2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**MARCELA SCABELLO AMARAL FERNANDES**

**“ANÁLISE COMPARATIVA CLÍNICA E MOLECULAR DA  
NEUROPATIA ÓPTICA HEREDITÁRIA DE LEBER (LHON)”**

**Orientadora: Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração Oftalmologia.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA MARCELA SCABELLO AMARAL  
FERNANDES E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. EDI LUCIA  
SARTORATO.**

-----  
Assinatura do Orientador

**CAMPINAS  
2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Am13a Amaral Fernandes, Marcela Scabello, 1969-  
Análise comparativa clínica e molecular da neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) / Marcela Scabello Amaral Fernandes. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Edi Lucia Sartorato.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neuropatia óptica. 2. Neuropatia óptica hereditária de Leber. 3. Doenças mitocondriais. 4. Tabaco. 5. Alcoolismo. I. Sartorato, Edi Lucia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Clinical and molecular comparative analysis of Leber hereditary optic neuropathy (LHON)

**Palavras-chave em inglês:**

Optic neuropathy

Leber hereditary optic neuropathy

Mitochondrial diseases

Tobacco

Alcoholism

**Área de concentração:** Oftalmologia

**Titulação:** Doutora em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Edi Lucia Sartorato [Orientador]

Jayter Silva de Paula

Maria Rosa Bet de Moraes Silva

Carlos Eduardo Leite Arieta

Carmen Silvia Bertuzzo

**Data de defesa:** 14-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARCELA SCABELLO AMARAL FERNANDES

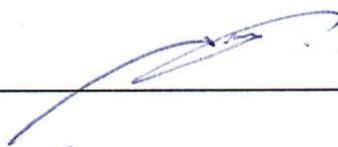
Orientador (a) PROF(A). DR(A). EDI LUCIA SARTORATO

## MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). EDI LUCIA SARTORATO



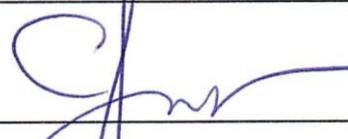
2. PROF(A). DR(A). JAYTER SILVA DE PAULA



3. PROF(A). DR(A). MARIA ROSA BET DE MORAES SILVA



4. PROF(A).DR(A). CARLOS EDUARDO LEITE ARIETA



5. PROF(A).DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 14 de agosto de 2013



*"Há apenas duas maneiras de se ver a vida:  
Uma é pensar que não existem milagres  
e a outra é acreditar que tudo é um milagre."*

**Albert Einstein**



*Aos meus amores, Yvens e Ana Clara,  
razões do meu viver.  
Aos meus pais, Renô e Thêreza (in memoriam),  
sempre uma luz em meu caminho.*



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato pela dedicação, incentivo e amizade que surgiu nestes seis anos de pesquisa.

À querida amiga Profa. Dra. Ana Maria Marcondes pela ideia do tema, conselhos e por confiar em mim.

Aos amigos e parceiros do CBMEG, Sueli Costa, Rogério Alves e, em especial, Paulo Maurício do Amor Divino Miranda. A colaboração e o incentivo de vocês foram essenciais para o desenvolvimento desta tese.

À grande amiga Carla Barros e residente Maria Eugênia que ajudaram na avaliação e seleção dos pacientes do grupo controle.

Às funcionárias do ambulatório de Oftalmologia do HC- UNICAMP, que sempre acolheram a mim e aos meus pacientes com carinho e dedicação. Agradecimento especial às funcionárias Márcia e Sílvia que realizaram exame de campo visual em todos os pacientes desta tese.

Aos pacientes do ambulatório de neurooftalmologia do HC- UNICAMP e aos voluntários do grupo Alcoólicos Anônimos (AA) que participaram deste estudo.

À Faculdade de Ciências Médicas e ao Hospital das Clínicas da UNICAMP berço de todo o meu conhecimento adquirido ao longo da graduação, residência médica e pós-graduação.

Aos amigos que torcem pelas minhas conquistas.

À minha família, meu porto seguro, pelo amor e apoio. Aos meus pais, meus maiores incentivadores, por minha formação pessoal e profissional. À minha irmã Adriana, minhas sobrinhas Luiza e Laura, pelo amor e amizade. À minha madrinha, tia Cristina, por me ouvir e aconselhar. Ao meu esposo Yvens, companheiro e grande incentivador da minha carreira. A minha amada filha Ana Clara por tentar entender e perdoar tantos momentos de minha ausência em função desta obra.



## RESUMO

A neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) é uma doença mitocondrial, com herança materna, caracterizada pela perda (sub) aguda, indolor e bilateral da visão, escotoma central ou cecocentral e discromatopsia, devido à degeneração do nervo óptico por apoptose das células parvo ganglionares da retina. As três mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A são responsáveis por 90 a 95% dos casos da LHON e acometem subunidades dos genes *MT-ND4*, *MT-ND6* e *MT-ND1*, respectivamente, que codificam proteínas para o complexo I da cadeia respiratória. Somente 5% dos pacientes possuem uma das demais mutações secundárias. A presença da mutação é fundamental para que LHON ocorra, no entanto, a penetrância incompleta e predileção pelo gênero masculino sugerem que fatores genéticos, epigenéticos e ambientais possam modular a expressão fenotípica da doença. O objetivo deste estudo foi analisar clínica e molecularmente para LHON 63 pacientes com neuropatia óptica, sendo 25 com quadro clínico típico de Leber (grupo I) e 38 com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer (grupo II), assim como verificar a relação entre os agentes tóxicos tabaco e álcool e uma possível suscetibilidade genética entre os pacientes que faziam uso abusivo destes agentes. Estes pacientes foram submetidos à avaliação oftalmológica completa no ambulatório de neuroftalmologia do HC-UNICAMP e tiveram suas amostras de sangue coletadas e analisadas no CBMEG. A pesquisa das três mutações primárias foi realizada pelas técnicas de restrição enzimática e sequenciamento direto, e confirmada pelo PCR-multiplex e Plataforma Sequenom. Os pacientes que não apresentaram uma das mutações primárias foram rastreados pelo sequenciamento direto e pela Plataforma Sequenom, para oito principais mutações secundárias: G3733A e C4171A (*MT-ND1*), T10663C (*MT-ND4L*) e G14459A, C14482G, C14482A, A14495G e C14568T (*MT-ND6*). Os haplogrupos dos pacientes mutantes foram pesquisados pela Plataforma Sequenom. Dos 63 pacientes com neuropatia óptica foram encontrados 18 pacientes mutantes, sendo 14 do grupo I (11 com G11778A e 3 com T14484C) e 4 do grupo II (3 com G11778A e 1 com T14484C). Os haplogrupos encontrados nestes pacientes mutantes foram: C, D, M, U, e, principalmente L1/L2 e L3, que mostra a presença de ancestral comum de origem asiática, europeia e, predominantemente, africana. Nenhum dos pacientes apresentou a mutação primária G3460A, assim como não foi encontrada nenhuma das 8 mutações secundárias rastreadas. Na análise estatística das variáveis estudadas houve diferença significativa para recorrência familiar materna, campo visual e presença de mutação, dentre os 63 pacientes com neuropatia óptica, sendo que achados mostraram que o quadro clínico clássico da doença descrito por Leber há mais de um século tem boa confiabilidade. Ao comparar as mesmas variáveis entre os 14 mutantes do grupo I com os 4 mutantes do grupo II, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis, evidenciando que o diagnóstico de LHON é molecular, através do rastreamento das mutações (inicialmente as primárias). Não foi possível estabelecer relação entre o uso abusivo do tabaco e álcool e uma suscetibilidade genética de base, isto é, a mutação da LHON, entre os pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer e com consumo abusivo destes agentes.

**Palavras-chave:** neuropatia óptica, Neuropatia Óptica Hereditária de Leber, LHON, doenças mitocondriais, tabaco e alcoolismo.



## ABSTRACT

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is maternally inherited mitochondrial disease, characterized by painless, bilateral, (sub) acute loss of vision, central or cecentral scotoma and dyschromatopsia, due to the degeneration of optic nerve by the apoptosis of the p-retinal ganglion cells. The three primary mutations G11778A, T14484C and G3460A account for 90 to 95% of the cases of LHON and affect subunits of genes *MT-ND4*, *MT-ND6* and *MT-ND1*, respectively, which encode proteins of the complex I of the respiratory chain. Only 5% of patients have one of the other secondary mutations. The mutation in mtDNA is essential for LHON occurs, however, the incomplete penetrance and the male predominance of the disease suggest that genetic, epigenetic and environmental factors may modulate the phenotypic expression of LHON. The aim of this study was to analyze clinical and molecularly for LHON 63 patients with optic neuropathy, 25 with classical clinical symptoms of Leber (group I) and 38 with optic neuropathy of unknown etiology (group II), as well as to investigate the relationship between toxic agents tobacco and alcohol and a possible genetic susceptibility among patients who were abusing these agents. These patients underwent complete ophthalmologic evaluation in the Neuro-Ophthalmology Outpatient HC-UNICAMP, had their blood samples collected and analyzed in CBMEG. The research of the three primary mutations was performed by restriction analysis and direct sequencing and confirmed by multiplex-PCR and Sequenom Platform. Patients who did not have one of the primary mutations were screened by direct sequencing and by Sequenom Platform for 8 major secondary mutations: G3733A and C4171A (*MT-ND1*), T10663C (*MT-ND4L*) and G14459A, C14482G, C14482A, A14495G and C14568T (*MT-ND6*). The haplogroups of mutant patients were screened by Sequenom Platform. Of 63 patients with optic neuropathy 18 patients were found to be mutants, 14 in group I (11 with G11778A and 3 with T14484C) and 4 in group II (3 with G11778A and 1 with T14484C). The haplogroups found in these mutants patients were: C, D, M, U, and especially L1/L2 and L3, which shows the presence of the common ancestor of Asian, European and, predominantly, African. None of the patients had a primary mutation G3460A, and nor it was found any of the eight secondary mutations screened. Statistical analysis of the variables studied showed significant differences for maternal familial recurrence, visual field and the presence of mutation among the 63 patients with optic neuropathy, demonstrating a good reliability to the classical clinical picture of the disease described by Leber over a century ago. When comparing the same variables among 14 mutants of group I with 4 mutants of group II, there was no statistically significant difference for any of the variables, indicating that the diagnosis of LHON is molecular, by tracking the mutations (initially the primaries ones). No relationship between abusive use of tobacco and alcohol and a genetic-based susceptibility, that is, the mutation for LHON could be correlated in patients with optic neuropathy of unknown etiology and history of heavy consumption of these agents.

**Keywords:** optic neuropathy, Leber Hereditary Optic Neuropathy, LHON, mitochondrial diseases, tobacco and alcoholism.



# **LISTA DE ABREVIATURAS**

---



## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	ATP sintetase
AV	Acuidade Visual
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
COX	Citocromo c oxidase
CV	Campo Visual
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desorribonucleotídeostriposfatados
EDTA	Etilenediaminotetracetatodissódico
FAD	Dinucleotídeo adenina-flavina
FADH2	Dinucleotídeo adenina-flavina oxidada
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Grama
HCl	Ácido clorídrico
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
L	<i>Ladder</i>
LHON	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber
MELAS	Encefalomiopatia Mitocondrial, Acidose láctica, Episódios semelhantes acidente vascular cerebral
MERRF	Epilepsia mioclônica com fibras vermelhas rotas
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
Min.	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
mtDNA	DNA Mitocondrial
<i>MT-CYB</i>	Gene mitocondrial do Complexo Citocromo b-c1
<i>MT-ND1</i>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 1
<i>MT-ND4</i>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4
<i>MT-ND4L</i>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4L
<i>MT-ND5</i>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 5
<i>MT-ND6</i>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 6
NaCl	Cloreto de sódio
NARP	Neuropatia, ataxia e retinose pigmentar
nDNA	DNA nuclear
NAD	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida
NADH	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida oxidada
Ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NOAD	Neuropatia óptica autossômica dominante
NOIA	Neuropatia óptica isquêmica aguda
NOTA	Neuropatia óptica tabaco-álcool

OCT	Tomografia de coerência óptica
OD	Olho direito
OE	Olho esquerdo
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
p-ganglionares	Parvo ganglionares
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição
PERGs	Eletrorretinogramas
Pi	Fosfato inorgânico
REDOX	Redução-Oxidação ou Oxirredução
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
Rpm	Rotações Por Minuto
Seg	Segundo
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)
TBE	Tris, Base, Ácido Bórico, EDTA
TE	Tris EDTA
Tm	Temperatura de <i>melting</i> (fusão)
U	Unidade
μL	Microlitro
Mg	Micrograma
(H)	Cadeia pesada do DNA Mitocondrial
(L)	Cadeia leve do DNA Mitocondrial
V	Volts
VDAC	Canais aniônicos de voltagem dependente
VEPS	Potencial visual evocado
VF-14	<i>Visual Function Index</i> (Índice da função visual)
°C	Graus centígrados
%	Porcentagem

# **LISTA DE TABELAS**

---



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Complexos enzimáticos que compõem a cadeia respiratória mitocondrial.....	39
<b>Tabela 2</b> - Mutações mitocondriais relacionadas à LHON.....	49
<b>Tabela 3</b> - Sequências dos primers utilizados.....	79
<b>Tabela 4</b> - Tamanho dos produtos de amplificação.....	79
<b>Tabela 5</b> - Produtos de amplificação submetidos à digestão por enzimas específicas e respectivos fragmentos de digestão de diferentes tamanhos. ....	82
<b>Tabela 6</b> - Sequência de primers para a amplificação da região em que foram rastreadas as mutações G3733A e C4171A no gene <i>MT-ND1</i> .....	90
<b>Tabela 7</b> - Sequência de primers para a amplificação da região em que foi investigada a presença da mutação T10663C no gene <i>MT-ND4L</i> .....	90
<b>Tabela 8</b> - Sequência de primers para a amplificação da região que foram rastreadas as mutações G14459A, C14482G, C14482A, A14495G e C14568T no gene <i>MT-ND6</i> .....	91
<b>Tabela 9</b> - Haplogrupos e seus respectivos marcadores (SNPs).....	92
<b>Tabela 10</b> - Compilação dos resultados encontrados para rastreamento das mutações primárias usando as técnicas de PCR-RFLP e Sequenciamento direto (UNICAMP, 2013). .....	97
<b>Tabela 11</b> - Haplogrupos dos indivíduos com mutação para LHON (UNICAMP, 2013).	100
<b>Tabela 12</b> - Média de idade de início da manifestação da doença entre os portadores de neuropatia óptica nos grupos I-a e I-b (UNICAMP, 2013). ....	101
<b>Tabela 13</b> - Média de idade de início da manifestação da doença entre os portadores de neuropatia óptica nos grupos II-a e II-b (UNICAMP, 2013). ....	102
<b>Tabela 14</b> - Dados descritivos das variáveis categóricas em relação aos grupos I-a, I-b, II-a e II-b de portadores de neuropatia óptica (UNICAMP, 2013), seguidos do resultado do teste de Qui-quadrado. ....	102
<b>Tabela 15</b> - Comparação da variável recorrência familiar entre os quatro grupos de pacientes com neuropatia óptica (UNICAMP, 2013).....	103
<b>Tabela 16</b> - Comparação da variável campo visual de OD e OE entre os quatro grupos de pacientes com neuropatia óptica (UNICAMP, 2013).....	103
<b>Tabela 17</b> - Comparação da variável mutação entre os quatro grupos de pacientes com neuropatia óptica (UNICAMP, 2013). ....	104
<b>Tabela 18</b> - Comparação da frequência de mutação dos grupos I-a x I-b de pacientes com diagnóstico clínico da LHON (UNICAMP, 2013).....	104
<b>Tabela 19</b> - Comparação da frequência de mutação dos grupos II-a x II-b de pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer (UNICAMP, 2013).....	105
<b>Tabela 20</b> - Comparação da frequência de mutação dos grupos I(a+b) e II(a+b) (UNICAMP, 2013). ....	105
<b>Tabela 21</b> - Dados descritivos das variáveis categóricas em relação aos mutantes dos grupos I e II, seguidos do resultado do teste de Qui-quadrado / Exato – Fisher (UNICAMP, 2013).....	106
<b>Tabela 22</b> - Resumo dos resultados das variáveis analisadas nos 18 pacientes com mutação para LHON (UNICAMP, 2013). ....	108
<b>Tabela 23</b> - Frequência das mutações nos 4 grupos de mutantes para LHON (UNICAMP, 2013) .....	109
<b>Tabela 24</b> - Grupo I-a - Pacientes com diagnóstico clínico de LHON, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n =17) .....	153

<b>Tabela 25</b> - Grupo I-b - Pacientes com diagnóstico clínico de LHON, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n=8) .....	154
<b>Tabela 26</b> - Grupo II-a - Pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n=7) .....	154
<b>Tabela 27</b> - Grupo II-b - Pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n=31) .....	155
<b>Tabela 28</b> - Grupo I-a - Pacientes mutantes com diagnóstico clínico de LHON, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool .....	157
<b>Tabela 29</b> - Grupo I-b - Pacientes mutantes com diagnóstico clínico de LHON, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool .....	158
<b>Tabela 30</b> - Grupo II-a Pacientes mutantes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool .....	158
<b>Tabela 31</b> - Grupo II-b Pacientes mutantes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool .....	158

# **LISTA DE FIGURAS**

---



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Desenho esquemático da mitocôndria. ....	38
<b>Figura 2</b> - Esquema da dupla cadeia do DNA mitocondrial.....	42
<b>Figura 3</b> - Diagrama da história migratória dos haplogrupos do mtDNA humano. ....	45
<b>Figura 4</b> - Campo visual de paciente com escotoma central em OD e OE. ....	51
<b>Figura 5</b> - Campo visual de paciente com escotoma cecocentral em OD. ....	51
<b>Figura 6</b> - Alterações de fundo de olho na fase aguda da LHON.....	52
<b>Figura 7</b> - Alterações de fundo de olho na fase crônica da LHON. ....	53
<b>Figura 8</b> - Esquematização da fisiopatologia da LHON.....	63
<b>Figura 9</b> - Organograma da estratégia resumida de análise dos estudos moleculares.....	77
<b>Figura 10</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11778A.....	80
<b>Figura 11</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T14484A .....	80
<b>Figura 12</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G3460A.....	81
<b>Figura 13</b> - Ciclos utilizados no sequenciamento.....	83
<b>Figura 14</b> - Esquematização da iPLEX® Gold Assay da Sequenom, Inc. (San Diego, CA), por meio da técnica MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry).....	86
<b>Figura 15</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações G3733A e C4171A.....	90
<b>Figura 16</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T10663C. ....	91
<b>Figura 17</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações G14459A, C14482G, C14482A, A14495G e C14568T. ....	91
<b>Figura 18</b> - Padrão de bandas para a mutação G11778A. (L) Ladder 10 pb Invitrogen®; (1) Controle mutante; (2) Controle sem mutação; (3)-(5) indivíduos mutantes; (6), (7) indivíduos sem a mutação. ....	97
<b>Figura 19</b> - Padrão de bandas para a mutação T14484C: (L) Ladder 100pb Invitrogen®; (1) Controle mutante; (2) controle normal; (3), (5), (6) e (7) pacientes sem mutação; (4), (8) e (9) pacientes com a mutação. ....	98
<b>Figura 20</b> - Padrão de bandas da PCR multiplex para o rastreamento das mutações primárias da LHON. (L) Ladder 100pb Invitrogen®; (1) Controle positivo G11778A; (2) Controle positivo T14484C; (3) Controle normal; (4) e (5) Pacientes mutantes para G11778A; (6) Paciente normal; Paciente mutante para T14484C. ....	98
<b>Figura 21</b> - Padrão gráfico gerado pelo software MassArray® Typer 4.0 no rastreamento da mutação primária G11778A. Pico apontado pela linha tracejada azul indica qual a base identificada pela plataforma Sequenom. a) Indivíduo mutante / b) Indivíduo normal.....	99
<b>Figura 22</b> - Padrão gráfico gerado pelo software MassArray® Typer 4.0 no rastreamento da mutação primária T14484C. Pico apontado pela linha tracejada azul indica qual a base identificada pela plataforma Sequenom. a) Indivíduo mutante / b) Indivíduo normal.....	99



# SUMÁRIO

---



# SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>1.1 A mitocôndria .....</b>	<b>37</b>
1.1.1- Estrutura e função da mitocôndria .....	37
1.1.2- Genoma mitocondrial .....	40
1.1.3- Heteroplasmia/homoplasmia.....	42
1.1.4- Herança materna .....	43
1.1.5-Haplogrupos .....	43
1.1.6- Doenças mitocondriais.....	45
<b>1.2 - Neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) .....</b>	<b>46</b>
1.2.1- Histórico.....	46
1.2.2- Mutações da neuropatia óptica hereditária de Leber.....	47
1.2.3- Epidemiologia.....	49
1.2.4- Manifestações clínicas.....	50
1.2.4.1- Fase pré-sintomática .....	50
1.2.4.2- Fase aguda .....	51
1.2.4.3- Fase crônica .....	52
1.2.4.4- Prognóstico visual .....	53
1.2.4.5- Achados extra-oculares.....	53
1.2.4.6- Diagnóstico.....	55
1.2.5- Penetrância incompleta e viés do gênero .....	55
1.2.6 - Fatores genéticos mitocondriais.....	56
1.2.6.1- Heteroplasmia .....	56
1.2.6.2- Haplogrupos do DNA mitocondrial - LHON .....	56
1.2.7- Fatores genéticos nucleares.....	57
1.2.8- Fatores epigenéticos.....	58
1.2.9- Fatores hormonais .....	59
1.2.10- Fatores ambientais .....	59

1.2.11- Fisiopatologia da LHON.....	60
1.2.12- Aconselhamento genético .....	64
1.3- Neuropatia óptica tabaco-álcool (NOTA) .....	64
2- OBJETIVOS .....	69
2.1-Objetivo geral .....	69
2.2- Objetivos específicos .....	69
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	73
3.1- Casuística .....	73
3.2- Métodos .....	75
3.2.1- Métodos dos Exames Clínicos .....	75
3.2.2- Análise Molecular .....	77
3.2.2.1- Extração de DNA de sangue periférico .....	77
3.2.2.2- Métodos de análise das mutações primárias.....	79
3.2.2.2.1- Rastreamento utilizando PCR-RFLP.....	79
3.2.2.2.2- Rastreamento das mutações primárias pelo método de sequenciamento direto.....	82
3.2.2.2.3 – Método alternativo e adaptado de PCR multiplex para a detecção das mutações G11778A, T14484C e G3460A.....	84
3.2.2.2.4 –Plataforma Sequenom - Espectrometria de massa.....	84
3.2.2.3- Métodos de pesquisa das mutações secundárias .....	89
3.2.2.4- Pesquisa dos haplogrupos.....	92
3.2.3- Métodos para análise estatística dos dados.....	93
4- RESULTADOS.....	97
4.1-Resultado Molecular .....	97
4.1.1-Resultado molecular do rastreamento das mutações primárias .....	97
4.1.2–Resultado molecular do rastreamento das mutações secundárias.....	100
4.1.3 – Resultado dos haplogrupos dos indivíduos mutantes.....	100
4.1.4 – Resultado molecular do grupo controle .....	100
4.2- Resultados da análise das variáveis clínicas .....	101
4.2.1- Resultado da análise dos 63 pacientes com neuropatia óptica .....	101
4.2.2- Resultado da análise dos 18 pacientes com mutação mitocondrial da LHON, confirmado pelo teste molecular. ....	106
4.2.3- Resultado da análise do grupo controle .....	110
5- DISCUSSÃO .....	113

<b>6 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>127</b>
<b>7 - BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>131</b>
<b>8 - APÊNDICES.....</b>	<b>153</b>
<b>9 - ANEXO.....</b>	<b>169</b>



# **INTRODUÇÃO**

---



## **1- INTRODUÇÃO**

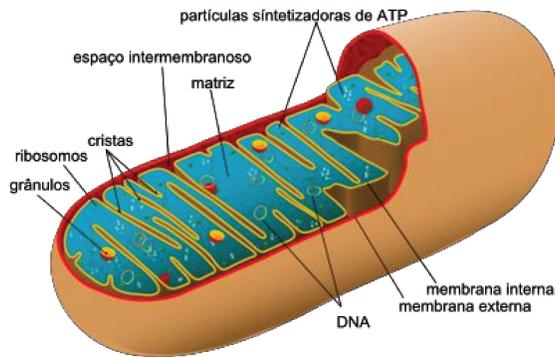
O entendimento da estrutura e fisiologia da mitocôndria e de como o DNA mitocondrial está organizado dentro das células, exercendo controle genético sobre a fisiologia celular é crucial para o entendimento da etiologia e progressão das doenças genéticas. As manifestações clínicas presentes nestas afecções são muito heterogêneas, e envolvem na maioria das vezes, diversos órgãos e tecidos (1). As desordens mitocondriais são a principal causa de doença crônica humana com uma prevalência estimada de 1 em cada 10.000 indivíduos do Reino Unido e cerca de 1 em cada 200 indivíduos são de risco para a manifestação da doença por serem portadores de mutação (2,3). O acometimento ocular é um achado frequente neste grupo e aponta para uma etiologia mitocondrial subjacente, a qual permite uma abordagem diagnóstica mais orientada. A disfunção do nervo óptico pode estar presente e ser a única manifestação, causando as duas neuropatias ópticas hereditárias mais comuns encontradas na prática clínica, a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) e a neuropatia óptica autossômica dominante (NOAD). Na grande maioria dos casos a patologia da LHON e NOAD é limitada a um grupo altamente especializado de células do olho, as células ganglionares da retina, mas o fenótipo associado com estas duas condições é amplo, sugerindo os possíveis caminhos que levam à degeneração do nervo óptico e falência visual (4).

### **1.1 A mitocôndria**

#### **1.1.1- Estrutura e função da mitocôndria**

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas encontradas em todas as células eucarióticas, relacionadas com a produção de energia celular, que possuem cromossomos próprios. São partículas esféricas e alongadas que podem medir de 0,5 a 1 micrometro de largura e até 10 micrometros de comprimento (5).

Estas organelas possuem estruturas tubulares em seu interior, interligadas pela membrana interna, a qual é delimitada pela membrana externa, o que cria dois espaços: o espaço intermembrana e o espaço matriz interna (6), como mostra a Figura 1.



**Figura 1- Desenho esquemático da mitocôndria.**

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/91/Animal\\_mitochondrion\\_diagram\\_pt.svg/562px-Animal\\_mitochondrion\\_diagram\\_pt.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/91/Animal_mitochondrion_diagram_pt.svg/562px-Animal_mitochondrion_diagram_pt.svg.png)

A membrana externa permite a difusão passiva de moléculas de baixo peso molecular e esta permeabilidade é conferida por uma família de proteínas formadoras de canais conhecidas como porinas ou canais aniônicos de voltagem dependente (VDAC). A membrana interna é altamente convoluta e possui múltiplas dobras, conhecidas como cristas, as quais aumentam enormemente sua superfície de área (7). Comparada com a membrana externa, a membrana interna é relativamente impermeável, exceto para canais de transporte ativo, estabelecendo um gradiente elétrico através desta barreira. A membrana interna também contém proteínas altamente especializadas, incluindo complexos da cadeia respiratória. A matriz mitocondrial contém moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) com estrutura nucleóide e é também, o local para múltiplas vias metabólicas essenciais para a função celular como: o ciclo do ácido cítrico, a biossíntese de aminoácidos, a oxidação de ácidos graxos, e principalmente a transformação de energia química dos metabólitos citoplasmáticos em energia acessível à célula, acumulada em componentes como o trifosfato de adenosina (ATP), a qual será utilizada pela célula quando esta necessitar de energia para realizar trabalho químico, mecânico, osmótico ou elétrico (8, 9, 10).

A geração de energia na mitocôndria começa quando, através do ciclo do ácido cítrico, a acetil-CoA (acetilcoenzima A), dos ácidos graxos e carboidratos, são oxidados para água e dióxido de carbono, liberando íons de hidrogênio que reduzem o NAD (dinucleotídeo adenina-nicotinamida) e o FAD (dinucleotídeo adenina-flavina) para NADH e FADH<sub>2</sub>, respectivamente. O NADH e FADH<sub>2</sub> são reoxidados pela cadeia respiratória, com conseqüente produção de moléculas de ATP. A produção de ATP pela redução do

oxigênio é conhecida como fosforilação oxidativa (OXPHOS) e gera a energia necessária para o funcionamento celular (11).

A cadeia respiratória mitocondrial compreende cinco complexos enzimáticos (subunidades) responsáveis pela OXPHOS, denominados: I- (NADH) – coenzima Q óxido-reductase, II- succinato desidrogenase-CoQ-óxido-reductase, III- coenzima Q citocromo C óxido-reductase, IV- citocromo c oxidase ou COX e V- ATP sintetase, conforme dados na Tabela-1.

**Tabela 1 - Complexos enzimáticos que compõem a cadeia respiratória mitocondrial**

<b>Complexo Enzimático</b>	<b>Número de Subunidades Nucleares</b>	<b>Número de Identificações das Subunidades Mitocondriais</b>
I - (NADH) - coenzima Q óxido-reductase	Aproximadamente 40	7 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6)
II-succinato desidrogenase-CoQ-óxido-reductase	4	0
III - coenzima Q citocromo C óxido-reductase	11	1 (citocromo b)
IV - citocromo c oxidase ou COX	13	3 (COXI, COXII, COIII)
V - ATP sintetase	14	2 (ATPase 6 e 8)

\*Modificado de Souza AFM, Giugliani R. Doenças Mitocondriais. In: Carakushanski E. Doenças Genéticas em Pediatria. Ed. Guanabara Koogan, RJ: 189-195, 2001.

Os complexos respiratórios contêm ainda subunidades que são codificadas pelo DNA nuclear (nDNA), as quais são sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos e, então, importadas para as mitocôndrias. A molécula de ATP é formada pelo ADP (difosfato de adenosina) e Pi (fosfato inorgânico), produzida através da energia livre gerada durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória. Os elétrons do NADH são removidos pelo complexo I enquanto os elétrons do succinato são retirados pelo complexo II. Os elétrons circulam através do complexo III para o citocromo c, em seguida para o complexo IV, e finalmente o oxigênio produz água. Esta necessidade de oxigênio torna o processo de transporte de elétrons uma cadeia respiratória. A energia gerada é liberada por esta cadeia transportadora de elétrons, sendo usada para a bomba de prótons por intermédio da membrana mitocondrial interna, criando um gradiente eletroquímico que é utilizado pelo

complexo V como uma fonte de energia potencial para condensar ADP e Pi, e fabricar ATP. Este ATP formado é então trocado por ADP através da membrana mitocondrial interna, sendo que o ADP pode ser resintetizado em ATP (9,11,12,13). Portanto, a OXPHOS é resultado da interação dos genomas nuclear e mitocondrial. Os genes do DNA nuclear (nDNA) codificam a maioria das proteínas mitocondriais, enquanto os peptídeos da OXPHOS codificados pelo mtDNA incluem subunidades do complexo I (de ND1 a ND6), complexo III, complexo IV ou citocromo C oxidase (CO1, CO2, CO3) e complexo V ou ATP sintetase (ATPase 6 e 8). O nDNA codifica também o RNA que permite a tradução mitocondrial e ainda produtos genéticos nucleares desconhecidos, responsáveis por coordenar a perpetuação e expressão do mtDNA (14,15).

Mutações que levam a alteração de um dos componentes da OXPHOS podem levar ao desenvolvimento de doenças mitocondriais devido à diminuição na produção de energia e ao acúmulo de metabólitos intermediários ou produtos tóxicos nas células. O resultado da falta de energia nos tecidos pode levar a fraqueza muscular, fadiga e distúrbios neurológicos, cardíacos, renais, endócrinos e oculares (15).

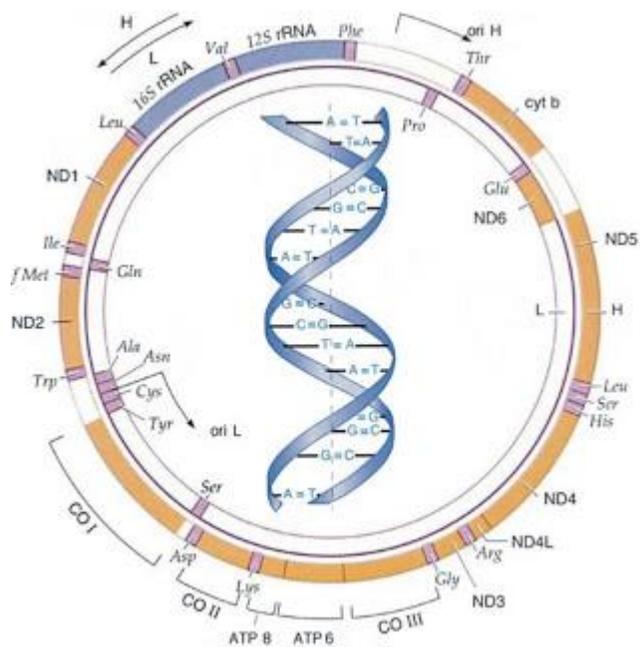
O número de mitocôndrias nas células humanas varia de quinhentas a até dez mil, de acordo com o organismo e o tecido em que essas células se encontram. Este número será diretamente proporcional à atividade metabólica de cada uma das células (16).

### **1.1.2-Genoma mitocondrial**

O genoma humano é composto pelo genoma nuclear, o qual compreende a grande maioria dos genes, e também pelo genoma mitocondrial. O genoma nuclear contém mais de 99% do DNA celular e está distribuído em 24 tipos diferentes de moléculas lineares com DNA de fita dupla, os 22 autossomos e os cromossomos sexuais X e Y. Os gametas são células haplóides (22 autossomos mais X ou Y) e as células somáticas são diplóides (22 pares de autossomos mais XX ou XY). A mitocôndria é uma organela citoplasmática relacionada à produção de energia celular, que possui cromossomos próprios. Desta forma, apesar da grande maioria dos genes estarem no núcleo das células, alguns poucos genes são extra-nucleares e compõem o genoma mitocondrial. A mitocôndria é a única das organelas que apresenta um DNA específico, o DNA mitocondrial (5).

O DNA mitocondrial foi descrito pela primeira vez por Van Bruggen, Sinclair e Stevens e Nass em 1966 (17), mas só foi totalmente sequenciado por Anderson e colaboradores (18), em 1981. O mtDNA apresenta 16.569 pares de bases organizados de maneira circular e codificam 2 RNAs ribossômicos, o pequeno (12S, MTRNR1) e o grande (16S, MTRNR2), 22 RNA transportadores. Estes RNAs estruturais são utilizados para a tradução de 13 polipeptídeos, que são unidades essenciais de quatro dos cinco complexos responsáveis pela fosforilação oxidativa mitocondrial. O complexo II é formado exclusivamente por subunidades codificadas pelo nDNA (9). O mtDNA é semi-autônomo, representa de 1 a 2% do DNA celular e codifica aproximadamente 10% das proteínas constitutivas das mitocôndrias. Sendo assim, para um bom funcionamento da mitocôndria é necessário a cooperação entre o nDNA e o mtDNA. Basicamente todas as demais proteínas necessárias para o funcionamento da mitocôndria são codificadas por genes localizados no núcleo, entre elas, as proteínas da cadeia respiratória, translocação de nucleotídeos, transporte de íons, replicação do mtDNA e também o aparato enzimático da transcrição do mtDNA, proteínas necessárias à produção de ribossomos mitocondriais e seus fatores de transcrição e demais proteínas mitocondriais. Essas proteínas são primariamente sintetizadas no citosol e direcionadas para as mitocôndrias através de complexos protéicos (19,20).

O genoma mitocondrial é, na sua maior parte, idêntico entre os indivíduos. No entanto, existe uma região de aproximadamente 1.100 pb (pares de bases), região D-loop, a qual não codifica e é muito variável, sendo, portanto, importante na identificação dos indivíduos. Esta região também é chamada de região de controle, pois serve para regular a transcrição dos genes dentro da região codificadora, bem como a replicação do DNA mitocondrial (5). O genoma mitocondrial é compacto e sem íntrons (porção do DNA que não tem função codificante, está ausente no RNA mensageiro maduro e não aparecem representadas nas proteínas), sendo composto por uma dupla fita circular, cujas fitas de mtDNA têm uma distribuição assimétrica de guaninas e citosinas, o que gera uma cadeia pesada (H) e outra leve (L). A cadeia L é responsável por codificar 9 genes (*MT-ND6* e 8 RNA transportadores), enquanto que a cadeia H codifica os 28 genes restantes, do total de 37 genes do mtDNA (21,22). A figura 2 mostra a dupla cadeia do mtDNA.



**Figura 2 - Esquema da dupla cadeia do DNA mitocondrial.**

Retirado de [http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/ross\\_lab/variations.cfm&docid](http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/ross_lab/variations.cfm&docid)

### 1.1.3- Heteroplasmia/homoplasmia

O número de mitocôndrias nas células humanas varia de quinhentas a até dez mil, de acordo com o organismo e o tecido em que essas células se encontram. Este número será diretamente proporcional à atividade metabólica de cada uma das células, característica conhecida como poli-plasmia. Na divisão celular, o mtDNA replica-se no interior da mitocôndria e esta se divide por fissão simples. As mitocôndrias distribuem-se aleatoriamente para as células-filhas. Uma célula pode conter tanto mtDNA mutante quanto normal simultaneamente, condição conhecida como heteroplasmia. Quando esta célula heteroplásmica se divide, suas células-filhas podem conter mtDNA com heteroplasmia, conter apenas mtDNA mutante (homoplasmia) ou apenas mtDNA normal (outro tipo de homoplasmia) (10,11,23,24). Essa segregação mitótica explica a grande variação da heteroplasmia entre diferentes tecidos ou até entre diferentes células do mesmo tecido (11). O fato da maioria das mutações no mtDNA estarem em heteroplasmia, suporta o conceito de limiar de mutação para patogenicidade. A relação entre a taxa de mutação e a atividade da cadeia respiratória tem sido bastante investigada em diferentes tecidos e a expressão fenotípica de uma mutação no mtDNA depende das proporções relativas de mtDNA

mutante e normal, sendo que as consequências deletérias da maioria das mutações mitocondriais na OXPHOS geralmente aparecem quando a proporção de DNA mitocondrial mutante excede 60 a 80% do DNA mitocondrial total (25,26,27). Há variações entre as diferentes mutações e os diferentes tecidos neste limiar bioquímico e, embora isto possa influenciar no padrão de acometimento do órgão e a severidade clínica relacionada com um defeito no mtDNA, estes mecanismos moleculares parecem ser ainda muito mais complexos (21). O mtDNA pode apresentar dois grupos distintos de mutações: os rearranjos e as mutações de ponto. Os rearranjos na maioria não são passados para as gerações futuras e podem ser: deleções, onde há exclusão de nucleotídeo de um determinado locus, e duplicações, onde há a adição de um nucleotídeo em um determinado locus. As mutações de ponto podem ser herdadas pela linhagem materna. Elas consistem em substituição de aminoácidos (condição rara descrita em algumas doenças neurológicas e oftalmológicas) ou substituição de nucleotídeos, onde o nucleotídeo de determinado locus é substituído por outro (por exemplo, o nucleotídeo adenina pode ser substituído por guanina). Além destas formas de mutações citadas, pode ocorrer a depleção, um tipo raro de mutação com drástica redução do mtDNA, que geralmente leva a uma condição letal (10,28).

#### **1.1.4- Herança materna**

A herança do genoma mitocondrial ocorre exclusivamente através da linhagem materna, ou seja, durante a formação da célula-ovo, o óvulo transmite uma cópia do genoma nuclear mais o genoma mitocondrial, enquanto que o espermatozóide contribui apenas com uma cópia do genoma nuclear, pois as mitocôndrias presentes no espermatozóide estão localizadas em sua cauda, a qual não penetra no óvulo durante a fecundação. Homens e mulheres herdam suas mitocôndrias e, portanto, as doenças mitocondriais, de suas mães, mas os homens não transmitem suas mitocôndrias para as gerações seguintes (10,29,30).

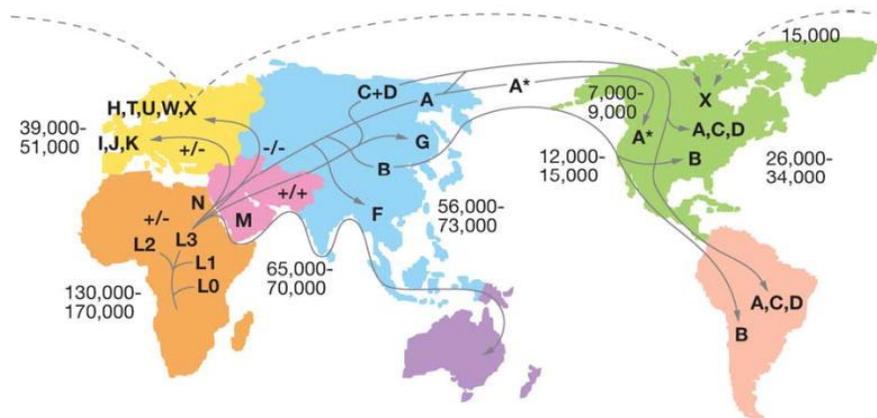
#### **1.1.5-Haplogrupos**

Os marcadores genéticos podem ser definidos como qualquer característica morfológica ou molecular que diferencia os indivíduos. Os polimorfismos, que são

pequenas variações na sequência de nucleotídeos, representam um tipo de marcador molecular. Encontram-se espalhados em centenas de milhares de posições diferentes através do genoma. Muitas dessas variações não prejudicam nenhuma função vital e não apresentam efeito no fenótipo. Os SNPs (*single-nucleotide polymorphism*) são as variações mais comuns entre os indivíduos, nas quais a diferença encontrada envolve uma única base no DNA (5). A alteração na sequência de nucleotídeos dentro do gene ocorre em um íntron ou éxon. Quando ocorre no éxon, há conseqüente alteração na sequência do códon, que pode resultar num aminoácido diferente. Qualquer alteração na sequência de DNA pode ser referida como mutação, podendo resultar ou não num fenótipo anormal. Na maioria das vezes os polimorfismos, que também são mutações só que encontradas em uma frequência acima de 1% na população, representam alterações que não resultam em fenótipos anormais e eventualmente alteram a proteína sem, entretanto, causar a doença, mas resultam em variações humanas (31).

O genoma mitocondrial acumula mutações com uma frequência significativamente mais rápida do que o genoma nuclear e vários fatores contribuem para isto: a falta de um mecanismo de reparo eficiente, a ausência de proteínas protetoras (como as histonas), a alta taxa de replicação do mtDNA que aumenta o risco de erros e a proximidade entre as moléculas do mtDNA e os complexos da cadeia respiratória, na qual os radicais de oxigênio, altamente mutagênicos, são gerados como subprodutos da OXPHOS (8, 32,33). A taxa de mutação varia entre diferentes regiões do mtDNA, e é muito mais rápida em duas regiões hipervariáveis (HVR I e II) do D-loop, onde se estima que uma mutação ocorra cada trinta gerações maternas (34,35). Portanto, o mtDNA é altamente polimórfico e durante a evolução humana, um número de variações relativamente benignas na sequência do mtDNA tornaram-se fixas em diferentes populações. Como o mtDNA é herdado da mãe, estes polimorfismos têm acumulado ao longo das linhagens maternas, seguindo o padrão da migração humana da África para os vários continentes desde 150.000 anos atrás (36). A árvore filogenética humana contém 18 haplogrupos principais do mtDNA, os quais compreendem um total de 497 variáveis polimórficas definidas. A história da migração dos haplogrupos do mtDNA humano, baseado em dados do Mitomap (37) e na publicação de Wallace em 2005 (2), mostra que o mtDNA do *Homo sapiens* surgiu na África cerca de 150.000 a 200.000 anos atrás, com o primeiro haplogrupo

específico africano, o L0, seguido pelo aparecimento das linhagens africanas L1, L2 e L3 (figura 3). No nordeste da África, L3 deu origem a duas novas linhagens, M e N. Somente mtDNAs M e N deixaram a África e colonizaram toda Eurásia, cerca de 65.000 atrás. Na Europa, N deu origem aos haplogrupos H, I, J, Uk, T, U, V, W e X. Na Ásia, M e N deram origem a diversas gamas de linhagens de mtDNA incluindo A, B e F derivados de N e C, D e G derivados de M. A, C e D tornaram-se enriquecidos no nordeste da Sibéria e atravessaram o Estreito de Bering cerca de 20.000 a 30.000 anos atrás para encontrar os Paleo-Índios. Há 15.000 anos, o haplogrupo X veio para a região central do Canadá tanto ao atravessar o Atlântico congelado ou através da rota da Ásia da qual não existem remanescentes nos dias de hoje. De 12.000 a 15.000 anos, o haplogrupo B entrou nas Américas, passando pela Sibéria e pelo Ártico, movendo-se ao longo da Costa da Beringia. Cerca de 7000 a 9000 anos atrás, um processo migratório trouxe um haplogrupo A modificado do nordeste da Sibéria para o noroeste da América do Norte. Enfim, relativamente recente, derivados dos haplogrupos A e D se moveram do Círculo Polar Ártico para encontrar os esquimós (<http://www.mitomap.org>). Os indivíduos com ancestrais europeus pertencem a um dos nove seguintes haplogrupos: H, I, J, K, T, U, V, W e X, com cerca da metade dos casos pertencentes ao haplogrupo H (38,39).



**Figura 3 - Diagrama da história migratória dos haplogrupos do mtDNA humano.**

Modificada de Wallace, 2005

### 1.1.6- Doenças mitocondriais

As mutações no mtDNA são responsáveis por diversas doenças genéticas. As manifestações clínicas presentes nestas afecções são muito heterogêneas, envolvendo, na

maioria das vezes diversos órgãos e tecidos. São descritas diversas manifestações sistêmicas, dentre elas podem ser citadas: acidose láctica, anemia sideroblástica, diabetes mellitus, disfunção pancreática, hepatopatia, hiperaldosteronismo, hipogonadismo, hipoparatiroidismo, hipotireoidismo, miocardiopatia, pancitopenia, pseudo-oclusão intestinal, transtornos no sistema de condução do coração, tubulopatias renais e manifestações neurológicas. Dentre estas últimas podem ser citadas a cefaléia vascular, convulsões, demência, depressão, distonia, mioclonia, miopatia, oftalmoplegia, ataxia, surdez e neuropatia (1,40).

As mutações no mtDNA podem ser por rearranjo e mutações de ponto, como já descrito anteriormente. Dentre os principais fenótipos associados a mutações pontuais no mtDNA estão a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), a síndrome que associa neuropatia, ataxia e retinose pigmentar (NARP), a Síndrome de Leigh de herança materna (MILS), a síndrome da encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios semelhantes a acidentes vasculares cerebrais (MELAS) e a epilepsia mioclônica associada a fibras *ragged-red* (MERRF) (14,41).

Embora os efeitos das mutações pontuais sejam em sua maioria de natureza multi-sistêmica, as manifestações do fenótipo podem ficar restritas a um único tecido ou órgão. É o caso da Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON), que levará à degeneração do nervo óptico, um tecido com grande demanda energética (36). As neuropatias ópticas hereditárias mais comuns na população geral são LHON e neuropatia óptica autossômica dominante (NOAD), e resultam em grande déficit visual em adultos jovens. Ambas possuem similaridades patológicas, com acentuada perda das células ganglionares da retina e acometimento do feixe papilo-macular (4).

## **1.2 - Neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON)**

### **1.2.1- Histórico**

Em 1871, o oftalmologista alemão Theodor Leber descreveu, pela primeira vez, a Neuropatia óptica hereditária de Leber como uma entidade clínica distinta. Ele descreveu as características do padrão de perda visual em membros de quatro famílias e suas

observações foram subsequentemente confirmadas em linhagens de diferentes populações. Estes primeiros estudos destacaram vários achados do LHON, incluindo a transmissão materna da doença, a perda visual predominantemente em homens, o acometimento quase que exclusivo do nervo óptico. Ele também notou que alguns destes pacientes sofriam de palpitação cardíaca (42).

Apenas em 1988 o padrão não mendeliano de herança foi desvendado, quando Wallace e colaboradores publicaram na revista Science a descoberta da primeira mutação de ponto no DNA mitocondrial (mtDNA) a ser associada com doença humana, correlacionando-a às famílias com quadro clínico de LHON. Desde então, surgiram inúmeras pesquisas relacionadas à clínica, genética e bioquímica da doença, buscando a melhor teoria que explique a patogênese e fatores determinantes para a expressão desta doença (43,44).

### **1.2.2- Mutações da neuropatia óptica hereditária de Leber**

A LHON é caracterizada pela perda súbita da visão em ambos os olhos, devido à degeneração do nervo óptico causada possivelmente por um processo apoptótico generalizado das células p-ganglionares da retina. É considerada a doença mitocondrial mais frequente na população caucasóide, sendo, portanto, de herança materna. O número de mutações relacionadas à LHON é controverso na literatura científica, pois publicações recentes trazem novas mutações associadas à LHON em genes que expressam subunidades dos complexos respiratórios I, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial. Em 2009, Man e colaboradores relataram vinte e uma mutações importantes (4). Segundo o maior Banco de Dados online sobre a LHON, o MITOMAP, mais de 30 mutações são atualmente relacionadas à doença (<http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON>) (37).

A maioria dos pacientes com LHON (90 a 95%) possui uma das três mutações primárias, as quais estão relacionadas a um maior risco de expressão fenotípica da síndrome. Somente 5% dos pacientes possuem uma das demais mutações, conhecidas como mutações secundárias. As três principais mutações de ponto para LHON são: G11778A, T14484C e G3460A e acometem subunidades de genes *MT-ND4*, *MT-ND6* e *MT-ND1*, respectivamente, que codificam proteínas para o complexo I da cadeia respiratória (45).

Wallace e colaboradores identificaram a mutação m.11778G>A em 1988 (43). Sua especial significância histórica se deve ao fato de ser a primeira mutação de ponto a ser associada à doença humana. É a mutação primária mais frequente na população mundial, correspondendo a 69% dos casos, podendo variar a frequência em populações específicas como: 50% dos casos na Europa, 69% na Finlândia e quase 95% na população asiática (4, 43, 46,47). Esta mutação é considerada como a de pior prognóstico, com perda visual mais grave e menor chance de melhora parcial de visão (4 a 25% dos casos) (48,49). Nela ocorre a troca de uma base guanina por adenina na posição 11778 do gene mitocondrial *MT-ND4* (NADH desidrogenase subunidade 4), que resulta na substituição do aminoácido arginina por histidina na posição 340 da proteína do complexo I da cadeia respiratória (43).

A mutação m.14484T>C é a segunda mais frequente na população mundial, onde é descrita em 14% dos casos (50,51). Na população franco-canadense é a mutação mais comum (87%) e resulta de um efeito fundador, isto é, mutação no gene é observada em alta frequência em uma população específica devido à presença da mutação em um único ancestral ou pequeno número de ancestrais (52). Ocorre a troca da timina por citosina na posição 14484 do gene mitocondrial *MT-ND6*, que conseqüentemente substitui o aminoácido metionina por valina na posição 64 da proteína do complexo I da cadeia respiratória (50,51). Pacientes com a mutação T14484C têm o melhor prognóstico, com maior probabilidade de melhora parcial da visão, em 37 a 58% dos casos (51).

A mutação m.3460G>A é a menos frequente na população mundial, ocorrendo em 13% dos pacientes. Nesta mutação a troca de uma guanina por adenina na posição 3460 do gene mitocondrial *MT-ND1*, acarreta uma mudança na sequência de aminoácidos, trocando uma alanina por uma treonina de uma proteína do complexo I da cadeia respiratória. Apresenta um fenótipo intermediário e as chances de melhora parcial da visão são de 22 a 25% dos casos (49,53,54).

Embora seja descrito um grande número de mutações secundárias, elas representam apenas 5% das ocorrências das mutações mitocondriais relacionadas à LHON. Estão presentes em quase todos os genes que até hoje foram descritos como portadores das principais mutações (*MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6* e *MT-CYB*), porém até o momento não têm um papel definido na etiologia da neuropatia e talvez possam influenciar na progressão da doença ou atuem como marcadores polimórficos de

diferentes haplogrupos (55). As mutações secundárias são geralmente associadas a síndromes e manifestações sistêmicas, como arritmias cardíacas, neuropatia periférica, miopatias não específicas e transtornos do movimento (4,56). Outros estudos descreveram a sobreposição de características de LHON e MELAS em portadores das mutações G3376A ou G3697A (57,58). A tabela 2 resume as mutações primárias e as principais mutações secundárias e seus respectivos genes.

Tabela 2- Mutações mitocondriais relacionadas à LHON.

<b>Alelos mutantes (%)</b>	<b>Mutação</b>	<b>Gene</b>
95%	m.11778G>A	<i>MT-ND4</i>
	m.14484T>C	<i>MT-ND6</i>
	m.3460G>A	<i>MT-ND1</i>
m.3635G>A		
m.3733G>A		
5%	m.4171C>A	<i>MT-ND4L</i>
	m.10663T>C	
	m.14459G>A	<i>MT-ND6</i>
	m.14482C>A	
	m.14482C>G	
	m.14495A>G	
	m.14568C>T	

### 1.2.3- Epidemiologia

LHON é doença do mtDNA mais comum, com uma prevalência mínima descrita de 1:31.000 de indivíduos afetados no nordeste da Inglaterra e 1:8.500 portadores da mutação com risco de perda visual (59). Prevalências similares têm sido descritas na população caucasóide, sendo 1:39.000 em indivíduos dos países Baixos e 1:50.000 na Finlândia (60,61). Cerca de 2% dos indivíduos registrados como cegos na Austrália possuem LHON (62).

A idade de início da manifestação da LHON tem seu pico entre 15 a 30 anos e 95% dos portadores da mutação que irão manifestar a perda visual o farão antes dos 50

anos de idade. No entanto, a deterioração visual pode ocorrer em qualquer idade, entre a primeira e a sétima década de vida (63,64). LHON deve fazer parte do diagnóstico diferencial de todos os casos de neuropatia óptica bilateral, simultânea ou sequencial, independente da idade de manifestação, principalmente em indivíduos do sexo masculino. A taxa de acometimento da LHON entre indivíduos do sexo masculino/feminino varia nas diferentes populações estudadas, sendo que a taxa mais descrita é de 4:1 (65). Porém, esses dados podem variar em diferentes publicações, já que são relatadas na literatura taxas que vão de 3.7:1 a 12.4:1 entre caucasóides (44,66) e 2.2:1 a 2.4:1 nos chineses (67). O tipo de mutação e o gênero ao qual o paciente pertence parecem não influenciar na idade e gravidade da manifestação da perda visual, embora tenha sido relatada, idade de início de manifestação da neuropatia discretamente maior em mulheres portadoras da mutação G11778A (48,49,50). Geralmente os pacientes com LHON apresentam familiares maternos também afetados, porém em 40% dos casos não há história familiar de perda visual. Este fato provavelmente se refere a casos nos quais é difícil traçar o heredograma, pois, casos de mutações *de novo* em LHON são raras (65).

#### **1.2.4- Manifestações clínicas**

##### **1.2.4.1- Fase pré-sintomática**

Estudos mostram que indivíduos assintomáticos portadores da mutação para LHON podem apresentar discretas oscilações da visão devido a anormalidades no fundo de olho como as telangiectasias dos vasos ao redor do disco óptico e edema da camada de fibras nervosas da retina. O exame de tomografia de coerência óptica mostrou em alguns portadores assintomáticos, espessamento da camada de fibras nervosas da retina temporal, dado este que reforça a ideia de que as fibras do feixe papilomacular são mais vulneráveis nesta doença (68). O defeito na visão de cores, principalmente na faixa verde-vermelho, também pode ser encontrado em portadores assintomáticos, conforme descrito em pesquisa realizada entre membros de uma família brasileira portadora da mutação G11778A. A redução na sensibilidade contraste e os parâmetros visuais subnormais em exames eletrofisiológicos podem estar associados em mutantes ainda assintomáticos (69).

### 1.2.4.2- Fase aguda

LHON é caracterizado pela falência visual bilateral, indolor, aguda ou subaguda, que ocorre em adultos jovens previamente saudáveis. Os homens são pelo menos quatro a cinco vezes mais suscetíveis em se tornarem afetados do que as mulheres. O início da doença é caracterizado pela perda da visão central, simultânea em ambos os olhos em 25% dos casos ou sequencial (75% dos casos), com uma média de acometimento entre os olhos de 2 a 3 meses (70). A acuidade visual é severamente reduzida para conta dedos ou menos na maioria dos casos e alcança sua máxima redução 4 a 6 semanas após o início da doença (71). O defeito de campo visual característico de LHON é o escotoma central ou cecocentral e pode ser documentado pela campimetria computadorizada ou pelo campímetro manual de Goldmann (4) (Figuras 4 e 5).

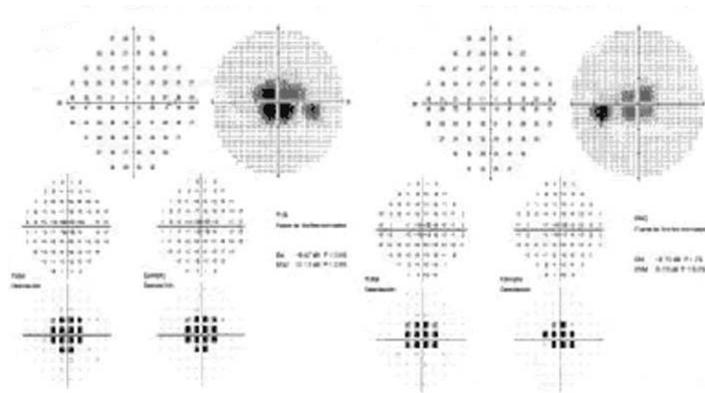


Figura 4 – Campo visual de paciente com escotoma central em OD e OE, respectivamente.

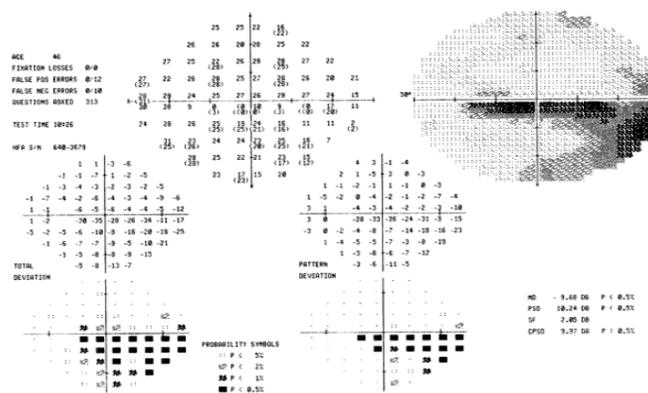


Figura 5 - Campo visual de paciente com escotoma cecocentral em OD.

A discromatopsia, com alteração principal na faixa de cores verde-vermelho, também caracteriza a doença. Importante ressaltar que geralmente não há defeito pupilar

aferente, sugerindo que as fibras retino tectais que auxiliam no reflexo pupilar a luz são menos suscetíveis aos efeitos da mutação mitocondrial da LHON (4).

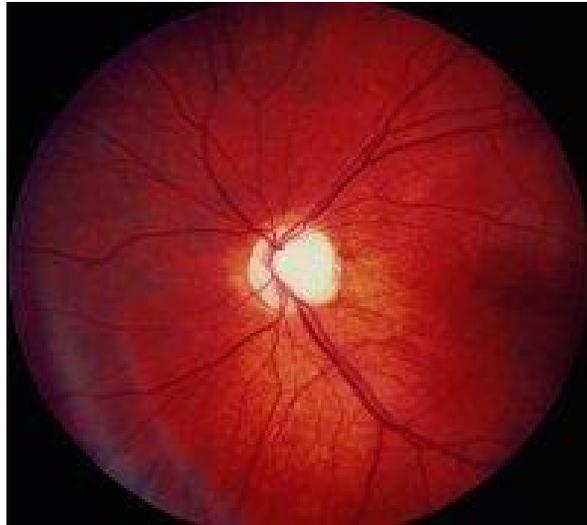
O exame de fundo de olho nesta fase pode ser totalmente normal em aproximadamente 20% dos casos, porém está alterado na maioria dos casos, com as seguintes anormalidades: tortuosidade vascular dos vasos centrais da retina, edema da camada de fibras nervosas e microangiopatia circumpapilar telangiectásica (figura 6). O exame de angiofluoresceínografia mostra um pseudoedema de disco, isto é, não há vazamento na fase inicial do exame (72).



**Figura 6 - Alterações de fundo de olho na fase aguda da LHON.**

#### **1.2.4.3- Fase crônica**

Após seis meses do início da doença, a atrofia óptica (figura 7) torna-se um achado universal, e o paciente atinge acuidade visual compatível com o diagnóstico de cegueira. Inicialmente pode haver uma palidez maior no setor temporal da papila, devido ao acometimento mais precoce das fibras do feixe papilomacular. Se o paciente é avaliado apenas em estágios tardios, pode ser difícil fazer o diagnóstico diferencial com outras neuropatias, como compressiva, infiltrativa e inflamatória, principalmente se não há história clara de herança materna. Nestes casos, enquanto não se obtém o resultado do teste genético molecular, um exame de neuroimagem se faz necessário (21).



**Figura 7 - Alterações de fundo de olho na fase crônica da LHON.**

#### **1.2.4.4- Prognóstico visual**

Uma melhora parcial dos parâmetros visuais pode ocorrer em alguns pacientes mesmo após vários anos do início da doença, e as chances de melhora estão relacionadas ao tipo de mutação, ocorrendo com maior frequência nos portadores da mutação T14484C, com menor frequência em pacientes com a mutação G11778A e com prognóstico intermediário nos mutantes G3460A, conforme já descrito anteriormente. A melhora da acuidade visual pode ser acompanhada de melhora do campo visual, com pequenas ilhas de visão no escotoma, chamadas de fenestrações e melhora na visão de cores, na dessaturação das cores. Fatores de bom prognóstico para a melhora visual são: idade precoce de manifestação da doença (menor que 20 anos), apresentação subaguda com lenta progressão do defeito visual e nervo óptico com grande superfície de área. A maioria dos pacientes, porém, persistem com grave déficit, sem sinais de melhora (51,70,73,74).

#### **1.2.4.5- Achados extra-oculares**

Embora o achado preponderante da LHON seja a falência visual, outros achados podem ser encontrados mais frequentemente em pacientes com esta doença do que em controles, como arritmias cardíacas e anormalidades neurológicas (tremor postural,

miopatias inespecíficas e neuropatias periféricas) (75,76,77). Estudo recente relatou o caso de um paciente com LHON, mutação G3460A e anormalidade do plexo braquial, sem sintomas de neuropatia periférica antes de sua morte. Amostras do plexo braquial de ambos os braços, obtidas pelo exame de necropsia e avaliadas pela microscopia eletrônica mostraram vários estágios de degeneração axonal de grandes fibras mielinizadas e fibras musculares com sinais de miopatia neurogênica, sem acometimento de outros nervos periféricos. Diferente dos achados anteriores que mostram maior vulnerabilidade de pequenos axônios, como se sugere que ocorra no nervo óptico de pacientes com LHON, este artigo mostra o acometimento de fibras nervosas maiores, ou seja, fibras nervosas de um plexo nervoso (78,79).

Há também as síndromes chamadas de “LHON plus” que são raras e associam ao quadro de acometimento visual, achados de déficits neurológicos graves como distonia espástica, ataxia e encefalopatia juvenil. Estas síndromes têm sido ligadas a várias mutações no DNA mitocondrial em linhagens isoladas da Holanda (A11696G e/ou T14596A), Austrália (T4160C) e América do Norte (G14459A) (80,81). LHON e MELAS (encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios tipo acidente vascular cerebral), estão relacionadas às duas mutações secundárias que codificam para o complexo I da cadeia respiratória, G3376A e G3697A (57,58). Outra associação importante, é que alguns indivíduos caucásóides portadores da mutação para LHON, principalmente mulheres com a mutação G11778A, apresentam achados clínicos, de neuroimagem e líquido indistinguíveis dos achados da esclerose múltipla, a doença de Harding. Isto iria de encontro com a hipótese do papel da autoimunidade na fisiopatologia desta doença mitocondrial (82). Até o momento, menos que 30 casos da doença de Harding (LHON associado a quadro clínico semelhante à esclerose múltipla) foram relatados. McClelland e colaboradores publicaram em 2011 (83) o relato de um caso em que a doença de Harding, de uma paciente com a mutação T14484C, mimetizou o quadro de neuromielite óptica soronegativa, também conhecida como Doença de Devic. Trata-se de uma doença inflamatória do sistema nervoso central, marcada pela neurite óptica bilateral, simultânea ou sequencial, aguda ou subaguda, e mielite transversa (83).

#### **1.2.4.6- Diagnóstico**

O diagnóstico de LHON pode ser elucidado pela extensa avaliação clínica oftalmológica, principalmente se os achados de exame forem associados à história familiar de perda visual de herança materna. O teste genético molecular de uma amostra de sangue periférico é o exame padrão para o diagnóstico e pode de usado para o aconselhamento genético. O exame molecular inicial deve ser feito pelo rastreamento das mutações primárias, uma vez não encontradas, pesquisam-se as mutações secundárias (4,42).

Em alguns casos pode ser necessário realizar exames eletrofisiológicos, incluindo eletrorretinogramas (PERGs) e potencial visual evocado (VEPs), para excluir patologia retiniana e confirmar neuropatia. Eletrocardiograma é recomendado para excluir síndrome de pré-excitação a qual pode estar associada em pacientes com LHON. Exames de neuroimagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, geralmente estão dentro da normalidade em pacientes com LHON, no entanto podem mostrar sinais relacionados a edema e gliose do nervo óptico na fase atrofica (4). Novos achados na ressonância magnética de crânio de dois pacientes com a mutação G11778A foram recentemente relatados. O artigo em questão mostrou não só o alargamento das vias visuais anteriores, nervos ópticos e quiasma, sem realce de contraste, como descrito em publicações anteriores, mas também do trato óptico, se estendendo até o corpo geniculado lateral (84).

#### **1.2.5- Penetrância incompleta e viés do gênero**

Duas questões relevantes em relação à LHON permanecem inexplicadas, a penetrância incompleta e o maior risco de homens manifestarem a doença (4:1). Somente cerca de 50% dos homens e 10% das mulheres portadores de uma das três mutações primárias relacionadas à LHON irão desenvolver a neuropatia óptica. Esta penetrância incompleta e a predileção por homens implicam que outros fatores adicionais, genéticos (mitocondriais ou nucleares), epigenéticos ou ambientais, além da presença da mutação, devem modular a expressão fenotípica da LHON. Hipóteses adicionais para explicar a maior frequência de neuropatia em indivíduos do gênero masculino resultariam da

combinação de variações anatômicas, hormonais e fisiológicas entre homens e mulheres (44,85).

## **1.2.6 - Fatores genéticos mitocondriais**

### **1.2.6.1- Heteroplasmia**

Dependendo da demanda metabólica, as células podem conter mitocôndrias em número variável de 500 a 10.000, e, cada mitocôndria de 2 a 10 moléculas de DNA. Isso resulta em um grande número de cópias. Na maioria das linhagens de LHON a mutação primária encontra-se em homoplasmia, isto é, todas as moléculas do DNA mitocondrial estão mutadas. Sugere-se que a heteroplasmia possa colaborar com a penetrância incompleta, e segundo esta teoria seriam necessários que 60% ou mais das moléculas do DNA mitocondrial estivessem mutadas para haver o risco de cegueira. Como a maioria dos indivíduos com LHON estão em homoplasmia, a proposta de um teste pré-sintomático em indivíduos com mutação para LHON, se mostra desnecessária (86,87).

### **1.2.6.2- Haplogrupos do DNA mitocondrial - LHON**

As mutações do DNA mitocondrial se acumulam numa velocidade pelo menos 10 vezes maior que o genoma nuclear, resultando em altas taxas de mutações. Por ter herança exclusivamente materna e não recombinar, estes polimorfismos acumulados acompanharam as mulheres ancestrais desde a África até os demais continentes nos últimos 150.000 anos. Os indivíduos com ancestrais europeus pertencem a um dos nove seguintes haplogrupos: H, I, J, K, T, U, V, W e X, com cerca da metade dos casos pertencentes ao haplogrupo H (38,39).

Estudo de meta-análise recente com 159 linhagens européias da LHON indicou que o risco de perda visual para as três mutações primárias é influenciado pelo haplogrupo do DNA mitocondrial. O risco de perda visual é maior quando as mutações G11778A e T14484C possuem o haplogrupo J, enquanto a mutação G3460A possui o haplogrupo K. Por outro lado, os portadores da mutação G11778A têm menor risco de perda visual

quando possuem o haplogrupo H. Os haplogrupos H, J e K são todos definidos como substituições polimórficas no gene *MT-CYB* que codificam para o citocromo b, a única subunidade do complexo III. Surge a hipótese que estas substituições no citocromo B possam influenciar o risco de perda visual pela modulação das consequências bioquímicas da mutação primária da LHON através de um efeito na estabilidade do supercomplexo I-III (88,89). A primeira evidência experimental de que a atividade do complexo III modula a manifestação da LHON associada à mutação G11778A foi realizado por pesquisadores chineses com células de linhagem linfoblástica derivadas de 5 pacientes de uma família chinesa (90).

Estudos em outras populações também têm verificado os haplogrupos das linhagens mutantes. Em 17 linhagens de chineses portadores da mutação G11778A foram descritos os seguintes haplogrupos: B4a, B5, C, D4, D5, F1, M1, M7b, M8a, M10a e N9a (91). O haplogrupo M7b1'2 tende a aumentar o risco de perda visual, enquanto o haplogrupo M8a tem um efeito protetor, isto é, diminui o risco de perda visual em chineses portadores da mutação G11778A (92). Estudo na população tailandesa mostrou que o haplogrupo B5a1 tem forte associação com pacientes de LHON portadores da mutação G11778A e parece aumentar o risco de perda visual nestes indivíduos, enquanto o haplogrupo F1 poderia ter um efeito protetor (93). Na população iraniana foi verificada associação entre as mutações G11778A e G3460A com os haplogrupos J e W, respectivamente (94). No Brasil uma grande linhagem de LHON portadora da mutação G11778A, com ancestral materno de origem italiana, pertence ao haplogrupo J (95).

### **1.2.7- Fatores genéticos nucleares**

A preferência pela manifestação da neuropatia em indivíduos do gênero masculino com mutação da LHON não pode ser explicada pela herança mitocondrial e sugere a existência de um gene de suscetibilidade recessivo ligado ao cromossomo X, agindo em sinergia com a mutação mitocondrial para a expressão do fenótipo. Homens portadores têm somente um cromossomo X e, diferente das mulheres portadoras, não podem compensar com outro X o alelo de suscetibilidade. As primeiras tentativas de identificar um locus de suscetibilidade no cromossomo X falharam, mas três estudos

recentes usando um maior número de indivíduos com LHON encontraram dois loci com alta probabilidade: Xp21-Xq21 e Xq25-27.2. Embora os genes causadores destas regiões de interesse não tenham sido identificados, o haplótipo de alto risco [DXS8090(166)-DXS1068(268)] no Xp21 foi definido como de risco para perda visual nos portadores das mutações G11778A e T14484C e não para G3460A (67,96,97). A possibilidade de outros genes modificadores nucleares não está excluída e novos estudos são necessários para explicar esta interação entre o genoma nuclear e o genoma mitocondrial na fisiopatologia da doença (21).

### **1.2.8- Fatores epigenéticos**

Conforme descrito anteriormente, a presença da mutação no mtDNA é fundamental para que o indivíduo manifeste a falência visual. No entanto, LHON apresenta penetrância incompleta, isto é, nem todos os mutantes irão manifestar a doença. Este fato poderia ser explicado por diferentes taxas de heteroplasmia, porém, a grande maioria dos indivíduos com LHON estão em homoplasmia (44). Isto sugere que outros fatores adicionais, genéticos (mitocondriais ou nucleares), epigenéticos ou ambientais, além da presença da mutação, devem modular a expressão fenotípica da LHON (91,98). Os fatores epigenéticos são caracterizados pela influência do ambiente nas manifestações dos genes, e têm sido intensamente estudados nas patologias oncológicas (99). Estes fatores envolvem o controle da expressão dos genes independente das variações na sequência de nucleotídeos do DNA e podem ser potencialmente transmitidos para a prole (99,100). Diferente dos fatores genéticos, os fatores epigenéticos são dinâmicos e reversíveis, e basicamente envolvem três mecanismos: a metilação dos resíduos de citosina nas regiões promotoras do DNA, mudanças na estrutura da cromatina através da acetilação e metilação das caudas N-terminais das histonas e controle pós-transcricional através dos micros RNAs (101,102). Os fatores epigenéticos mais investigados na expressão fenotípica da LHON são os efeitos do consumo excessivo do tabaco e do álcool (85,103,104,105). Outro fator epigenético relacionado ao LHON é o efeito tóxico de poluentes do ar, como a fumaça da queimada de madeira, pneus e outros poluentes industriais. Os produtos destes poluentes, como o cianídeo e o monóxido de carbono, derivados do tabaco e da fumaça têm mostrado inibir a

atividade do citocromo c oxidase e pode reduzir o limiar de uma função respiratória mitocondrial já comprometida nos portadores da mutação (106,107). No entanto, novos estudos são necessários para determinar a forma como esses fatores epigenéticos controlam a expressão do gene mutante no mtDNA dos portadores da LHON.

### **1.2.9- Fatores hormonais**

Fatores hormonais poderiam ter efeito protetor nas mulheres portadoras de mutação para LHON, interferindo na penetrância da expressão fenotípica da doença. Esta hipótese foi investigada usando um modelo com células de osteossarcoma com uma das três mutações primárias. Este modelo exibiu elevados níveis de espécies reativas do oxigênio, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e elevada taxa de apoptose, com maior fragmentação das mitocôndrias quando comparada com a cultura controle. Ao tratar a cultura de células com 17 beta-estradiol houve aumento nos níveis celulares de enzimas antioxidantes e melhora do funcionamento mitocondrial (108).

### **1.2.10- Fatores ambientais**

Vários estudos acompanhando gêmeos monozigóticos portadores da mutação para LHON têm sido relatados e dois de cinco pares desses gêmeos permanecem discordantes em relação à manifestação fenotípica da doença (65,107). Embora o gêmeo não afetado possa manifestar a perda visual a qualquer momento, a existência desta discordância sugere que fatores ambientais devem interferir na penetrância da doença. Há várias publicações de estudo caso-controle, com amostras pequenas, tentando correlacionar o consumo do tabaco e do álcool com a perda visual em portadores da mutação, com achados contraditórios (85,103,109,110,111). Em um estudo, que inclui irmãos afetados e não afetados de 80 linhagens da LHON, o consumo elevado de tabaco e álcool não alterou a probabilidade de falência visual (104). No entanto, estudo multicêntrico recente foi realizado para esclarecer se o consumo abusivo de tabaco e álcool poderia deflagrar a perda visual. Foram comparados 196 portadores da mutação para LHON afetados e 206 portadores não afetados. Este estudo mostrou que o tabaco está fortemente associado com o

risco de perda visual e, este efeito foi dose dependente, com o risco de perda visual maior nos indivíduos que fazem consumo abusivo do tabaco do que nos indivíduos que o fazem de forma comedida. Em relação ao consumo abusivo do álcool, o estudo sugeriu correlação com a perda visual, porém os resultados não foram estatisticamente significativos (105). Estes resultados sugerem aconselhar os portadores da mutação para LHON a não fumarem e a ingerirem álcool de forma moderada. Embora nenhum estudo funcional tenha sido realizado, o tabaco pode acometer a fosforilação oxidativa mitocondrial, tanto pelo efeito tóxico direto na atividade respiratória do complexo I, quanto reduzindo a concentração do oxigênio (85,104,105). Há também relatos de que fatores ambientais possam precipitar a perda visual em portadores da mutação: trauma craniano, doença sistêmica aguda, estresse psicológico, déficit nutricional, exposição a toxinas industriais (n-hexano), drogas antiretrovirais (106,111,112,113,114). Por outro lado, em algumas linhagens a penetrância do LHON parece estar diminuindo, o que pode estar associado à melhora dos fatores sócio-econômicos e ambientais. No entanto, o papel dos fatores ambientais ainda não está bem definido e estudos epidemiológicos com maior número de pacientes e dados ambientais são necessários para definir este papel (115).

### **1.2.11- Fisiopatologia da LHON**

A presença da mutação é condição indispensável para a manifestação da falência visual, mas, provavelmente, outros fatores devem estar associados para que a doença ocorra. A fosforilação oxidativa produz o maior estoque de ATP das células e isto ocorre pela cadeia respiratória em cinco complexos localizados na membrana mitocondrial interna. Todas as três mutações primárias para LHON envolvem subunidades do complexo I e seu impacto na fosforilação oxidativa têm sido investigado em ensaios bioquímicos com diferentes tipos celulares, os quais suportam evidências que o principal prejuízo está na síntese de ATP, com subsequente degeneração das células ganglionares da retina devido à falência energética (21). No entanto, estudos bioquímicos tanto *in vivo* quanto *in vitro* produziram resultados conflitantes sobre a extensão da disfunção da cadeia respiratória na LHON, com variações explicadas em parte, pelos diferentes protocolos de estudos com diferentes tipos celulares (plaquetas, leucócitos, fibroblastos, músculo esquelético), porém

nunca realizados nas células ganglionares da retina, por motivos de inacessibilidade destas. Estudos *in vivo* confirmaram o defeito bioquímico na LHON, com redução mais pronunciada na síntese de ATP na mutação G11778A, seguido pela T14484C e G3460A (116). Uma observação importante nestes estudos é que não houve diferença bioquímica significativa entre os portadores da mutação de LHON afetados e não afetados, o que sugere que LHON é associada a defeito na cadeia respiratória mais súbito do que outras mutações patogênicas do DNA mitocondrial (42). Em outro estudo, o estresse oxidativo levou à produção de radicais livres e foram encontrados níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio em híbridos transmitocondriais carregando uma das três mutações primárias (117). Pacientes com LHON têm a taxa alpha-tocopherol/lipídio reduzida e níveis de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina elevados em seus leucócitos sanguíneos, ambos marcadores de produção de espécies reativas do oxigênio aumentadas (118). Modelos bioquímicos mostram acometimento da atividade da proteína excitatória transportadora de aminoácidos (EAAT1), a qual é altamente relevante para a sobrevivência das células ganglionares da retina, uma vez que estão envolvidas no transporte do glutamato para células de Muller da camada interna da retina. O aumento das espécies reativas do oxigênio e da excitotoxicidade do glutamato é potente indutor da morte celular por apoptose (119).

A maior vulnerabilidade das células ganglionares da retina na LHON é bastante questionada e, conseqüentemente estudada. O mais óbvio é que estas células requerem maior quantidade de ATP para seu funcionamento, suportada por estudos que mostram alta atividade enzimática nas células ganglionares e na camada de fibras nervosas. No entanto, dois fatos falam contra esta afirmação, os fotorreceptores têm uma demanda oxidativa muito maior do que as células ganglionares; ou outras desordens mitocondriais caracterizadas por defeitos mais graves na atividade do complexo I não causam atrofia óptica. É possível que as células ganglionares da retina sejam preferencialmente acometidas porque são mais sensíveis ao desequilíbrio oxidativo celular e ao aumento de radicais livres (120).

Algumas peculiaridades anatômicas do nervo óptico podem ajudar a explicar esta maior vulnerabilidade das células ganglionares da retina a este defeito genético. A lâmina cribosa é uma placa perfurada de colágeno que marca a transição anatômica do nervo óptico humano de uma porção pré-laminar desmielinizada para a outra porção pós-

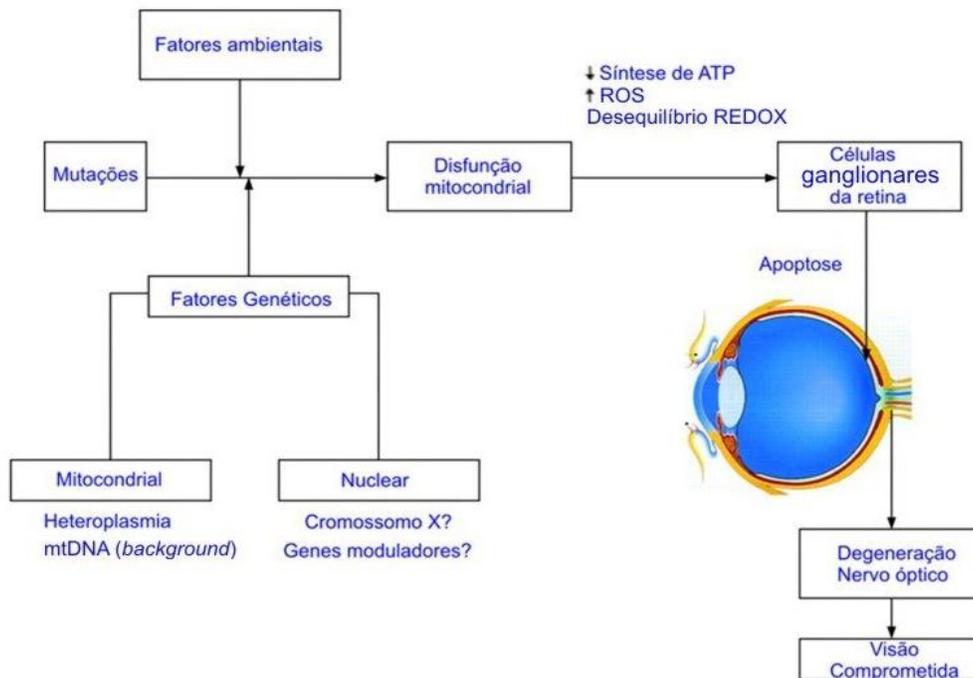
laminar mielinizada. Os axônios das células ganglionares da porção pré-laminar têm maior concentração de mitocôndrias para suportar a maior demanda energética da condução nervosa que ocorre na ausência de mielinização, enquanto os axônios mielinizados da porção pós-laminar, demandam menor energia na condução nervosa saltatória e, por isto, têm menor concentração de mitocôndrias. A porção pré-laminar do nervo óptico pode ser considerado um ponto de choque metabólico, mais vulnerável, que magnifica as consequências de qualquer prejuízo súbito na fosforilação oxidativa mitocondrial (121). A mitocôndria não está isolada, e faz parte de um intrincado sistema de citoesqueleto o qual localiza áreas de maior demanda energética. Estas interações mitocôndria-citoesqueleto ocorrem na lâmina cribosa e em outros locais que demandam a manutenção do gradiente mitocondrial, como o nódulo de Ranvier. O transporte axonal nos longos axônios das células ganglionares é dependente de trilhos de microtúbulos. O transporte axonal pode ser interrompido por dois processos, defeito bioquímico mitocondrial ou problema primário na manutenção no trabalho dos microtúbulos. A distinção entre estes processos é desnecessária, uma vez que um precipita o outro, gerando um círculo vicioso, onde o edema axonal devido à estase axoplasmática, leva a degeneração axonal, consequente morte celular, marcando o início e progressão dos sintomas clínicos (122).

Outra consideração anatômica importante é que as células ganglionares parvocelulares do feixe papilomacular da retina são muito finas e possuem pequena área de secção, o que pode deixá-las em situação de maior desvantagem em termos de reserva mitocondrial, quando comparadas às células ganglionares magnocelulares (123).

A morfologia do nervo óptico também pode estar implicada na suscetibilidade à doença. Os portadores de LHON não afetados têm áreas de discos ópticos maiores quando comparados a portadores afetados e a controles normais. Dentre os portadores afetados, a melhora parcial da visão pode estar associada ao maior diâmetro vertical do disco óptico e não ao maior diâmetro horizontal do disco, com melhor prognóstico visual em discos maiores (124). Isto sugere uma possível correlação entre a anatomia do disco óptico e a expressão fenotípica das mutações primárias da LHON, semelhante à correlação que ocorre na neuropatia óptica isquêmica aguda (NOIA) e o disco de risco, pequeno e elevado (125). Edema transitório e segmentar da camada de fibras nervosas da retina tem sido observado em portadores assintomáticos e com a imagem do nervo óptico pela tomografia de

coerência óptica (OCT), esse espessamento do setor temporal da camada de fibras nervosas tem sido confirmado (126,127). O edema dos axônios das células ganglionares da retina é secundário à estase do fluxo axoplasmático e reflete o estado de comprometimento energético destes neurônios. Se os axônios do nervo óptico são congenitamente empacotados em espaço relativamente confinado, pode ocorrer uma síndrome de compartimento, dificultando o fluxo axonal. Os finos capilares ao redor da lâmina cribosa tornam-se comprimidos pelo edema circundante, resultando em isquemia, que pode levar a um ciclo-vicioso e precipitar a perda visual. Este conceito de disco de risco pode explicar o papel de fatores ambientais, como o risco do consumo abusivo do tabaco em aumentar a expressão da doença nos portadores assintomáticos da mutação. Pacientes tabagistas têm maior alteração vascular arterosclerótica que podem exacerbar a hipóxia da cabeça do nervo óptico (128).

A figura 8 resume a fisiopatologia da LHON.



**Figura 8 - Esquemática da fisiopatologia da LHON.**

Imagem modificada retirada de Man PY et al J Med Genet 2002:39:162-9.

### **1.2.12- Aconselhamento genético**

Os portadores de uma das mutações primárias para LHON devem ser orientados que não é possível prever se e quando irão manifestar a perda visual. Em relação ao gênero pode ser dito que indivíduos do sexo masculino têm o risco de perda visual de aproximadamente 50%, enquanto que, o risco nas mulheres é aproximadamente 10%. Quanto à idade, pode-se dizer que a grande maioria dos pacientes que manifestam a falência visual o faz entre a segunda e terceira décadas de vida e este risco diminui com o aumento da idade, sendo mínimo, após os 50 anos. Uma vez que um indivíduo tenha seu diagnóstico confirmado pelo teste genético molecular, este exame deve ser oferecido aos demais familiares de linhagem materna, para descartar uma mutação *de novo*, a qual é rara. Desde que LHON tem herança mitocondrial, estritamente materna, pode-se assegurar que nenhum portador irá transmitir a mutação para a prole, diferente das portadoras, que irão transmiti-la para toda a prole. Desde que quase todas as mães portadoras da mutação da LHON estão em homoplasmia, seus filhos irão herdar apenas células com conteúdo mitocondrial totalmente mutado. Nas situações de heteroplasmia é mais complexo prever, pois as mães podem transmitir diferentes quantidades de DNA mitocondrial mutado para seus filhos. O que pode ser dito para os portadores assintomáticos em heteroplasmia é que para a expressão da doença ocorrer, o limiar de mutação medido nas células do sangue deve ser de 60% ou mais, situação similar para o teste do nível de heteroplasmia pré-natal, realizado em material obtido da punção amniótica ou das vilosidades coriônicas (4).

### **1.3- Neuropatia óptica tabaco-álcool (NOTA)**

A neuropatia óptica tabaco álcool está inserida no grupo da neuropatia óptica tóxica, descrita como uma entidade nosológica não apenas subdiagnosticada, como também diagnosticada em estágios tardios, quando a melhora da visão já não é mais possível. A via óptica anterior é suscetível ao dano causado por várias toxinas. A exposição às substâncias tóxicas pode ocorrer no ambiente de trabalho, pela ingestão de toxinas em materiais e alimentos contaminados. Indivíduos de ambos os sexos, de qualquer idade ou raça são suscetíveis. A Neuropatia óptica tóxica é caracterizada pela lesão do feixe papilomacular da retina, com conseqüente escotoma central ou cecocentral e alteração na visão de cores. As

neuropatias ópticas tóxicas têm muitas causas correlacionadas que levam ao quadro clínico, como exemplo, o efeito sinérgico entre fatores tóxicos e nutricionais em várias destas desordens. O quadro clínico, em geral, é caracterizado pela perda visual indolor, progressiva, simétrica e bilateral, com discromatopsia, com alteração principalmente do vermelho, escotoma central ou cecocentral e perda da acuidade visual (20/40-20/200). A neuropatia pode resultar dos seguintes agentes: Ingestão de metanol, tratamento com dissulfiram para alcoolismo crônico, hidroquinolonas halogenadas (medicação amebicida), ethambutol e isoniazida (tratamento da tuberculose), antibióticos como linezolida e cloranfenicol, cimetidina, vincristina e ciclosporina, citrato de sildenafil (para disfunção erétil), dapsona (medicação para lepra e doenças reumatológicas), tabaco e álcool. Doenças sistêmicas que levam à produção de substâncias tóxicas como Diabetes mellitus, falência renal e doenças da tireóide podem causar este tipo de neuropatia (129).

A NOTA é uma doença caracterizada pela perda indolor, subaguda ou progressiva da visão, com escotoma cecocentral ou central e discromatopsia, ocorrendo mais frequentemente em homens, que fazem consumo abusivo do tabaco, álcool ou ambos (130). Na fase aguda, as alterações características do fundo de olho incluem alterações na microvasculatura retiniana e peripapilar, as quais não vazam contraste na fase inicial do exame de angiofluoresceínografia, ou seja, não há edema de disco verdadeiro (131). Atrofia óptica aparece em estágios tardios da doença. É importante ressaltar que o nervo óptico pode ter aparência normal.

Embora a etiologia seja multifatorial, indivíduos que fazem consumo abusivo do tabaco e/ou álcool são de risco maior para neuropatia óptica nutricional porque tendem a ser mal nutridos. Os principais déficits nutricionais são das vitaminas do complexo B, particularmente tiamina (vitamina B1) e cianocobalamina (vitamina B12). Deficiências na riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), piroxidina (vitamina B6) e ácido fólico parecem também ter seu papel. Outra hipótese para a patogênese da perda visual seria, além da deficiência nutricional, o efeito tóxico direto do tabaco e do álcool sobre as células nervosas, inibindo a cadeia transportadora de elétrons e a função mitocondrial. A melhora visual pode ocorrer com a abstinência e tratamento com dieta balanceada e vitaminas do complexo B (132). A causa da perda visual pelo consumo abusivo do álcool nunca foi

comprovada, no entanto, uma suscetibilidade de base que predisponha o paciente a esta condição tem sido postulada (130).

A publicação de um artigo histórico sobre a neuropatia óptica pelo tabaco adescrive como uma entidade rara e distinta da NOTA, pois a neuropatia óptica tabaco álcool seria classificada como uma neuropatia óptica nutricional. No entanto, é difícil fazer o diagnóstico diferencial entre estas patologias, uma vez que grandes alcoolistas são em sua maioria grandes tabagistas (133).

O diagnóstico da neuropatia óptica tabaco álcool é de exclusão. Uma vez que há muitas semelhanças entre o quadro clínico de LHON e NOTA, e que, a patogênese da neuropatia óptica tabaco álcool não está bem definida, muitos pesquisadores tentaram associar a presença de uma suscetibilidade de base para a falência visual, como a presença de mutação da LHON, nos indivíduos com consumo abusivo de tabaco e álcool. Estes estudos não obtiveram resultado estatisticamente significativo para estabelecer uma associação (109,130).

Um estudo de caso-controle foi feito baseado na possibilidade de fatores ambientais poderem deflagrar a perda visual em indivíduos suscetíveis pela presença da mutação para LHON. A hipótese seria que o defeito de base na fosforilação oxidativa pela mutação mitocondrial, reduziria o limiar energético celular, o qual não suportaria um estresse maior causado pelo tabaco e pelo álcool. No entanto, também não foi possível confirmar esta associação (104). Um estudo multicêntrico recente, não conseguiu estabelecer uma associação entre o consumo abusivo do álcool e a expressão fenotípica da LHON, porém conseguiu identificar uma associação entre o tabaco e a perda visual, e que esta relação foi dose dependente, isto é, somente tabagistas que fumavam grande número de cigarros mostraram esta relação (105).

# **OBJETIVOS**

---



## **2- OBJETIVOS**

### **2.1-Objetivo geral**

Analisar clínica e molecularmente dois grupos de pacientes brasileiros: com quadro clínico típico de neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON) e com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, na tentativa de fazer a correlação fenótipo/genótipo e explicar a expressão variável desta condição.

### **2.2- Objetivos específicos**

I- Verificar a frequência das mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A.

II- Verificar a frequência das oito principais mutações secundárias:

- G3733A e C4171A - Gene *MT-ND1*
- T10663C- Gene *MT-ND4L*
- G14459A, C14482G, C14482A, A14495G e C14568T - Gene *MT-ND6*

III- Pesquisar os haplogrupos dos pacientes que apresentaram alteração molecular.

IV- Verificar a relação entre os agentes tóxicos tabaco e álcool e a suscetibilidade genética de base da doença.



# **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---



### 3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1- Casuística

O projeto deste estudo está de acordo com as normas reguladoras de pesquisa em seres humanos, resolução 196/96 do Ministério da Saúde, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (parecer 690/2004).

Entre agosto de 2007 e outubro de 2012, sessenta e três pacientes com neuropatia óptica, sendo 25 com diagnóstico clínico da LHON e 38 com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, foram avaliados no ambulatório de neuroftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP/ Departamento de Otorrino-Oftalmologia. Também foram avaliados trinta e dois indivíduos controle, sem alteração da função visual, com histórico de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool, voluntários da entidade Alcoólicos Anônimos de Campinas (grupo controle).

Todos os pacientes, antes do início do estudo, foram informados a respeito dos objetivos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Informado, fundamentado na Declaração de Helsink e nas diretrizes para coleta de amostras de Doença Genética Humana (*National 863-Plan*) e pelo Comitê de Ética em pesquisa da FCM-UNICAMP.

Os critérios de inclusão para os 63 pacientes não relacionados foram: pacientes com diagnóstico prévio de neuropatia óptica, com perda visual indolor e bilateral, aguda ou subaguda, acuidade visual menor ou igual a 20/50 para longe e menor ou igual a J3 para perto, discromatopsia e escotoma central ou cecocentral.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com cirurgia ocular ou qualquer patologia sistêmica ou ocular que possam causar perda visual. Exames de neuroimagem, tomografia computadorizada ou Ressonância Magnética, foram realizados para excluir qualquer anormalidade neurológica, em todos os pacientes com neuropatia óptica, independente do grupo ao qual o paciente pertence.

Para a divisão destes 63 pacientes em 4 grupos, foram usados os seguintes critérios:

Para incluir o indivíduo no grupo de pacientes com diagnóstico clínico da LHON, este deveria ser do sexo masculino e ter no máximo 30 anos de idade quando manifestou os sintomas da doença.

Para pertencer ao grupo de neuropatia óptica de etiologia a esclarecer o paciente poderia ser de ambos os sexos e ter manifestado a perda visual em qualquer idade. Este grupo compreende os pacientes com neuropatia óptica cujos exames clínicos, laboratoriais e de neuroimagem não permitiram fechar o diagnóstico definitivo.

Para verificar a relação entre os fatores ambientais tabaco e/ou álcool e a suscetibilidade genética de base da doença, o paciente deveria ter feito uso abusivo do tabaco (20 cigarros/dia por pelo menos 1 ano) e/ou álcool (100mL/dia de bebida destilada por pelo menos 1 ano).

Desta forma, os 63 pacientes com neuropatia óptica ficaram divididos em quatro grupos:

- Ia- grupo de 17 pacientes com diagnóstico clínico da LHON, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.
- Ib- grupo de 8 pacientes com diagnóstico clínico da LHON, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.
- IIa- grupo de 7 pacientes com diagnóstico de neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.
- IIb- grupo de 31 pacientes com diagnóstico de neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.

O quinto grupo se refere aos 32 pacientes do grupo controle, cujos critérios de inclusão foram: ter idade maior que 18 anos, de ambos os sexos, qualquer raça, com acuidade visual corrigida melhor ou igual a 20/30 para longe e J1 para perto, todos os demais exames oftalmológicos e laboratoriais normais, sem sinais ou sintomas de doenças neurológicas e com antecedente de consumo abusivo do tabaco e/ou álcool.

## 3.2- Métodos

### 3.2.1- Métodos dos Exames Clínicos

**Anamnese completa** de todos os pacientes foi realizada de acordo com os seguintes tópicos:

- História detalhada da perda visual;
- Questionamento sobre exposição aos agentes tóxicos: tabaco e álcool;
- Antecedentes mórbidos pessoais;
- Antecedentes familiares e heredograma.

O **exame oftalmológico completo** constou dos seguintes itens:

1- Medida da acuidade visual corrigida. Realizada com auxílio de refrator e tabela de Snellen posicionada a 6 metros;

2-Avaliação da visão de cores. Realizado pelo método de Ishihara. O exame consta de 15 pratos coloridos e foi considerado anormal, quando o paciente acertou 9 pratos ou menos;

3-Medida da pressão intraocular:

Realizada com o tonômetro de aplanção de Goldmann, após instilação de 1 gota de colírio anestésico e 1 gota de fluoresceína sódica colírio em cada olho. O exame foi considerado normal se a pressão intraocular for menor ou igual a 20 mmHg.

4-Avaliação biomicroscópica do segmento anterior do globo ocular em Lâmpada de fenda.

5-Avaliação do nervo óptico

Realizada com o paciente sob midríase, após instilação de colírio de tropicamida 1% em ambos os olhos, com lente de Volk 78 em lâmpada de fenda. Os parâmetros de nervo óptico a serem analisados são: relação dimensão da escavação/dimensão da papila vertical e horizontal, coloração da rima nervosa e avaliação da camada de fibras nervosas, neste caso, com filtro de luz verde.

6-Avaliação de fundo de olho com oftalmoscópio indireto, para descartar patologias retinianas congênitas ou adquiridas.

## 7- Campimetria Computadorizada

Realizada em aparelho da marca Humphrey estratégia SITA- *standard*, programa 24-2 que determina o limiar de sensibilidade de 54 pontos localizados nos 24 graus centrais, estendendo-se a 30 graus nasalmente, com pontos situados a cada 6 graus.

### **Exames complementares:**

- Exame de imagem cerebral, tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética. Realizado para descartar processos expansivos, traumáticos, vasculares, inflamatórios e desmielinizantes nos dois grupos de pacientes com neuropatia óptica;

- Exames laboratoriais, realizados para descartar patologias sistêmicas, que com frequência, cursam com neuropatia óptica (Diabetes Mellitus, discrasias sanguíneas, déficits nutricionais, sífilis):

- Glicemia de jejum;
- Hemograma completo;
- Dosagem sérica de ácido fólico;
- Dosagem sérica de vitamina B12 (cianocobalamina);
- Sorologia para Sífilis.

### 3.2.2- Análise Molecular

**Estratégia de análise:** para o diagnóstico molecular foi estabelecida uma estratégia, resumida na figura 9.

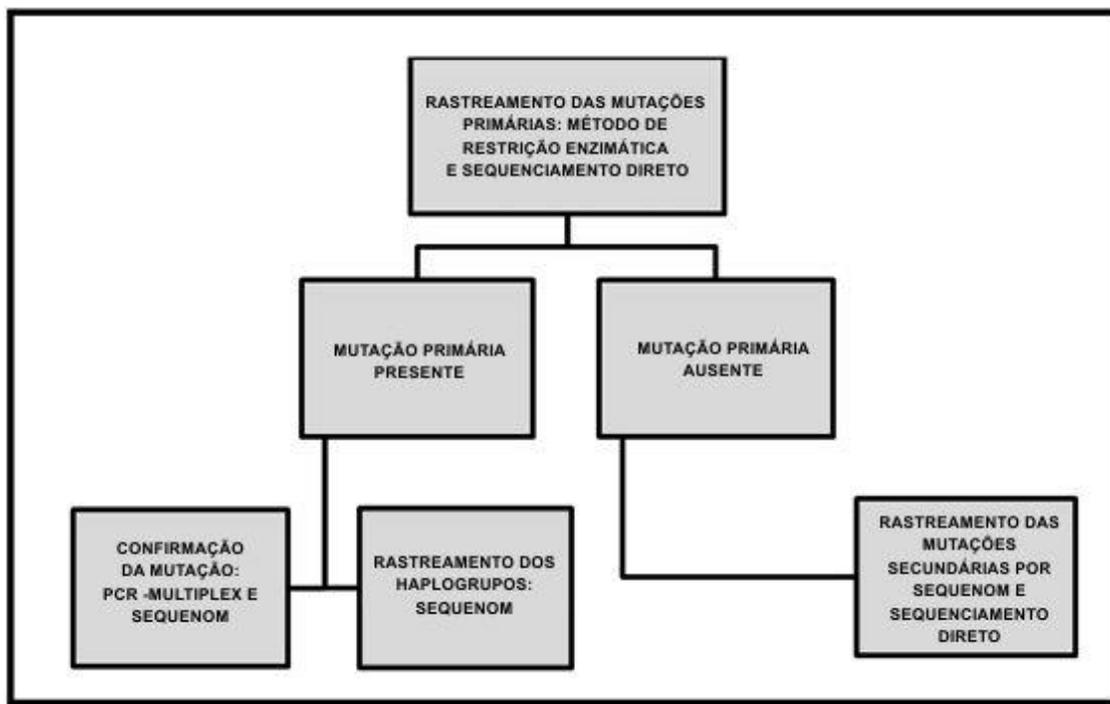


Figura 9 - Organograma da estratégia resumida de análise dos estudos moleculares.

#### 3.2.2.1- Extração de DNA de sangue periférico

Uma amostra de 10 a 15 mL de sangue venoso periférico foi colhida por venopunção e armazenada a 4°C em 2 tubos Vacutainer contendo EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico) 10%, de tampa roxa/lavanda (Greiner Bio-one Catalogue no. 455036; Frickenhausen, Germany).

A amostra foi enviada para o Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP (CBMEG) para análise das mutações mitocondriais da LHON.

A extração do DNA genômico das amostras de sangue colhidas foi feita utilizando-se protocolos manuais de extração de DNA com fenol e clorofórmio. Inicialmente, para lise das hemácias, foi adicionada solução A (Triton-X 100 a 1%; MgCl<sub>2</sub> 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0) ao sangue coletado até o volume de

50mL. Após ser homogeneizado, o material foi mantido em gelo por 30 minutos. Passado esse tempo o material foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. Depois dos 15 minutos o sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) foi ressuspensão em 35mL de Solução A. Esta última operação foi repetida por três vezes, até a obtenção de um *pellet* branco, livre de hemácias lisadas. Tal *pellet* foi então ressuspensão em 1mL da solução B 1X (Na<sub>2</sub>EDTA 20mM; NaCl 20mM; Tris-HCl 20mM pH 8,0) concentrada e 250µL de solução C (para 1mL de solução C: 0,5mL de solução B, 1mg de Proteinase K [Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha] e 0,5mL de SDS 10%). Essa mistura foi incubada em banho-maria a 56°C por aproximadamente 2 horas. Em alguns casos esse período de incubação foi de 18 horas a 37°C no banho-maria.

Após a incubação, foi iniciada a etapa de purificação do DNA genômico com a remoção de peptídeos e proteínas de soluções aquosas com fenol-clorofórmio. Foi então adicionado 1,0mL de TE 1x (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e quantidade suficiente de fenol saturado com Tris-HCl 10 mM pH 8,0 até dobrar o volume da amostra. A mistura foi homogeneizada por inversão lenta do tubo durante 5 minutos. Para separação e recuperação da fase aquosa (sobrenadante) o tubo foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi passado para outro tubo. O procedimento foi repetido por duas vezes, primeiro substituindo o fenol por uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e por último com por uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

Para precipitação do DNA, foi acrescentado 0,1 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado à fase aquosa. O DNA precipitado foi recuperado com auxílio de uma haste plástica esterilizada e lavado com etanol 70%, para retirada do excesso de sal, antes de ter sido ressuspensão em volume de 200µL de TE 1x.

A verificação da qualidade do DNA genômico extraído foi realizada a partir da eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1x (Tris-Borato-EDTA - TBE 10X é composto de Trisma Base a 0,089M, Ácido Bórico a 0,089M e EDTA a 0,002 e em pH 8,0). A amostra foi aplicada no gel juntamente com tampão de corrida (0,25% de Azul de Bromofenol; 50% glicose) na razão de 6:1. As condições de corrida foram de 120 V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi corado em solução diluída de Brometo de Etídio

(0,5mG/mL) durante 10 minutos, sendo visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera digital EDAS-Kodak.

### 3.2.2.2- Métodos de análise das mutações primárias

A análise genética molecular das mutações mitocondriais primárias foi realizada usando o DNA extraído dos leucócitos do sangue periférico. Primeiramente as mutações primárias, G11778A, T14484C e G3460A, foram rastreadas utilizando a técnica de restrição enzimática PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) e o sequenciamento direto. Os resultados encontrados foram validados utilizando o método de PCR-Multiplex e a Espectrometria de massa (Plataforma Sequenom).

#### 3.2.2.2.1- Rastreamento utilizando PCR-RFLP

A amplificação dos fragmentos foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”) mostrados na tabela 3. Os fragmentos amplificados compreenderam as regiões que continham as três mutações pontuais pesquisadas neste trabalho (tabela 4).

**Tabela 3 - Sequências dos primers utilizados**

Mutação	Primers
G11778A	sense: aac tac gaa cgc act cac ag
	anti-sense: gaa gtc ctt gag aga gga tta
T14484C	sense: gta gta tat cca aag ata acc a
	anti-sense: ctt cta agc ctt ctc cta
G3460A	sense: ggc tac tac aac cct tcg c
	anti-sense: ggc tct ttg gtg aag agt ttt

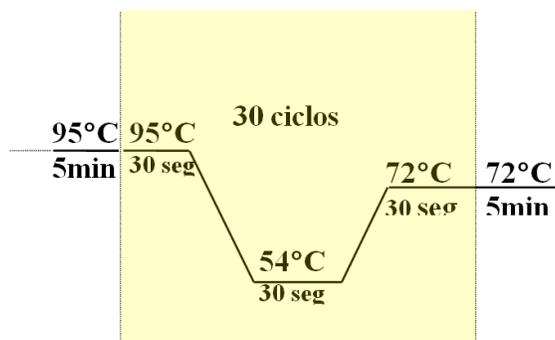
**Tabela 4 - Tamanho dos produtos de amplificação**

Mutação	Tamanho dos produtos de amplificação
G11778A	49pb
T14484C	154pb
G3460A	49pb

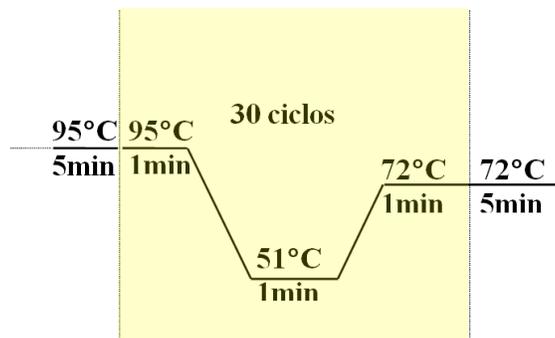
\* pb: Pares de base

Para todas as reações de amplificação a mistura da reação, com volume total de 25  $\mu\text{L}$  foi constituída de 2,0  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA (200  $\eta\text{g}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  da solução tampão 10X sem  $\text{MgCl}_2$  para a enzima *Taq* polimerase (Gibco®), 0,75 $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM), 2,0  $\mu\text{L}$  de cada “*primer*” (0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 5,0  $\mu\text{L}$  de dNTP (1,25mM), 0,3  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerase (Gibco®), 1,3  $\mu\text{L}$  de albumina e 9,15  $\mu\text{L}$  de água bidestilada.

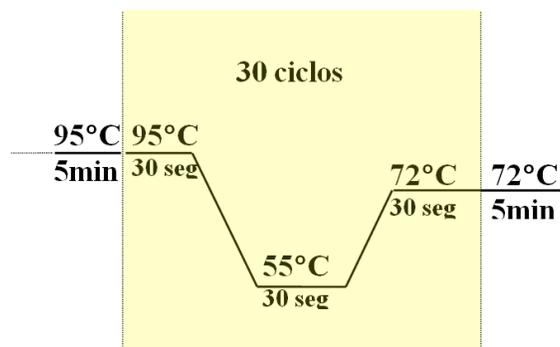
As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Gene Amp PCR System 2400 - Perkin Elmer®). Foram então realizados repetidos ciclos de aquecimento a 94° C para desnaturação do DNA, seguido da temperatura de anelamento específica para cada par de *primers*, e então de 72° C para a extensão das novas fitas de amplificação. As condições da PCR estão resumidas nas Figuras 10 a 12.



**Figura 10 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11778A.**



**Figura 11 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T14484A**



**Figura 12 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G3460A.**

A confirmação da amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose 2% posteriormente corado com brometo de etídeo. O gel é constituído de 100 mL de tampão TBE (Tris, Ác. Bórico, EDTA). Misturou-se 5,0 µL das amostras amplificadas a 2,0 µL de tampão de corrida (glicose 50%, azul de bromofenol 0,25%). Foram utilizados marcadores de peso molecular (DNA Ladder) de 25pb ou 50pb (Gibco -BRL<sup>®</sup>), de acordo com o tamanho do produto de amplificação. A corrida eletroforética foi feita a 150 V por aproximadamente 30 min. O gel foi então levado ao transiluminador com lâmpada ultravioleta para visualização e foi fotografado com a câmera digital EDAS-Kodak.

As regiões amplificadas foram digeridas com as enzimas de restrição específicas de acordo com a Tabela 5. As amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em géis de acrilamida 12% (TBE 10X, bis acrilamida 40%, persulfato de amônio 10%, temed e água deionizada) ou agarose 2% a 150V, com os tempos de corrida específicos para o tamanho dos fragmentos. Após a corrida eletroforética os géis foram corados com brometo de etídeo e levados ao transiluminador com lâmpada ultravioleta.

Para a análise da mutação G11778A, os fragmentos de 49pb obtidos pela reação da PCR foram digeridos com a enzima *Sfa* NI. Em indivíduos normais a enzima reconhece o sítio de restrição, onde age e corta o produto do PCR em 2 fragmentos menores, de 17pb e de 32pb. Nos indivíduos mutantes, a mutação abole o sítio de restrição, a enzima não corta o fragmento de 49pb em 2 fragmentos menores, permanecendo o fragmento único inicial. A enzima *Bsa* BI foi utilizada para pesquisa da mutação T14484C. Na ausência de mutação o fragmento amplificado de 154pb é cortado em fragmentos de 19pb e 135pb pela enzima de restrição. Na presença de mutação, o sítio de restrição é abolido, não ocorre o corte e permanece o fragmento único de 154pb.

Finalmente, para a análise de restrição da mutação G3460A, os fragmentos amplificados de 49pb pela PCR foram digeridos com a enzima *Bsa* HI. Na ausência de mutação são observados fragmentos de 22 e 27 pb. Quando há mutação, a troca de bases leva a perda do sítio de restrição, não ocorre o corte do fragmento de 49pb pela enzima. Nos três casos, caso houvesse mutação em heteroplasmia, esperava-se encontrar também fragmentos de tamanho normal.

**Tabela 5- Produtos de amplificação submetidos à digestão por enzimas específicas e respectivos fragmentos de digestão de diferentes tamanhos.**

<b>Mutação</b>	<b>Produto de Amplificação</b>	<b>Enzima de restrição</b>	<b>Fragmentos</b>
G11778A	49pb	<i>Sfa</i> NI	Sem mutação: 22pb e 27pb Com mutação: 49pb
T14484C	154pb	<i>Bsa</i> BI	Sem mutação: 19pb e 135pb Com mutação: 154pb
G3460A	49pb	<i>Bsa</i> HI	Sem mutação: 22pb e 27pb Com mutação: 49pb

### **3.2.2.2.- Rastreamento das mutações primárias pelo método de sequenciamento direto.**

O rastreamento das mutações primárias foi realizado com o uso do **ABI prism Big Dye Terminator cycle sequencing Ready Reaction kit V 3.1** (ABI Prism/ Applied Biosystems, Foster City, CA) e analisadas no **ABI Prism 3100 Genetic Analyzer** (Applied Biosystem).

O método de amplificação das três regiões de interesse é semelhante ao já descrito anteriormente para o rastreamento das mutações primárias usando a técnica de PCR-RFLP, usando os mesmo primers e ciclos (tabelas 3 e 4).

Após a amplificação das regiões de interesse, o método de sequenciamento direto prosseguiu com as seguintes etapas:

**Purificação dos produtos de PCR** - Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando-se o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega). Após a purificação, as amostras foram quantificadas usando o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) para posterior sequenciamento.

**Reação de sequenciamento automático para produto de PCR** - As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático **ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer**, utilizando-se o *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit V3.0 Ready Reaction* (ABI PRISM/PE Biosystems) e, constituíram-se de:

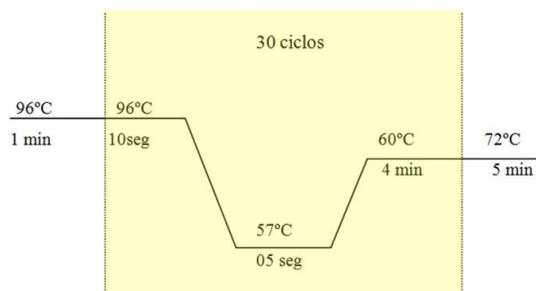
40-80ng de DNA

2µL do mix BigDye

1µL do primer direto ou reverso (5pmol/µL)

H<sub>2</sub>O deionizada para completar 10µL

A reação de sequenciamento consistiu de 30 ciclos nas condições especificadas na Figura 13.



**Figura 13 - Ciclos utilizados no sequenciamento.**

**Purificação e Liofilização** - As reações de sequenciamento prontas foram purificadas e liofilizadas de acordo com as seguintes etapas:

- foram adicionados 80µL de etanol 80%;
- centrifugou-se por 45 minutos a 3.700 rpm;
- foi descartado o etanol em papel absorvente;
- foram adicionados 150µL de etanol 70%;
- foi centrifugado por 10 minutos a 3.700 rpm;
- o etanol foi descartado da mesma forma;
- centrifugou-se rapidamente com a placa invertida

**Colocação da placa no sequenciador** - As reações foram mantidas à temperatura ambiente até o momento da colocação da placa no **ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer**. Antes da colocação da placa no sequenciador, as seguintes etapas foram seguidas:

- foi adicionado 10µL de formamida;
- a placa foi homogeneizada e em seguida centrifugada rapidamente;
- a amostra foi desnaturada (5 minutos a 95°C)
- em seguida a amostra foi colocada por 10 minutos no gelo;
- a placa foi colocada no sequenciador

**Análise das sequências obtidas** - As sequências obtidas foram analisadas e comparadas com a sequência normal com o auxílio dos softwares *Chromas Lite 2.01* e *CLC Sequence Viewer 6.0.1*.

#### **3.2.2.2.3 – Método alternativo e adaptado de PCR multiplex para a detecção das mutações G11778A, T14484C e G3460A.**

O PCR multiplex foi adaptado a partir do método descrito em 2010 por Bi e colaboradores, os quais desenvolveram um teste diagnóstico envolvendo as três mutações primárias da LHON na mesma PCR (134). Um conjunto de quatro pares de *primers* amplifica quatro fragmentos diferentes: 664pb, 359pb, 462pb e 808pb referentes à, respectivamente, controle da reação, mutação G11778A, mutação T14484C e mutação G3460A.

#### **3.2.2.2.4–Plataforma Sequenom – Espectrometria de massa.**

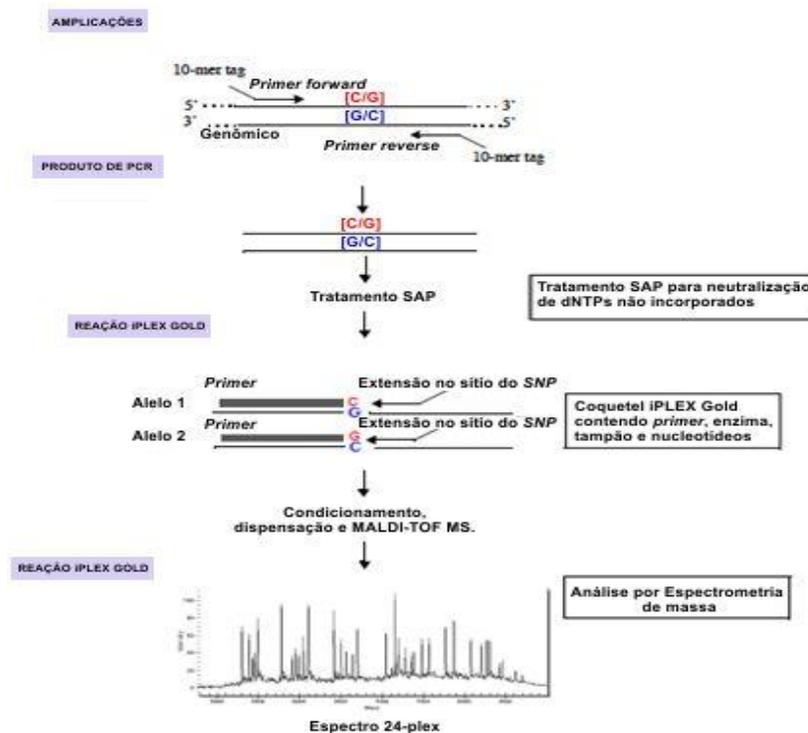
- **Definição:** a técnica MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) foi iniciada em 1988 como um método revolucionário para ionização e análise de massa de muitas biomoléculas. Os pesquisadores descobriram que a irradiação de cristais formados por pequenas moléculas orgânicas adequadas (chamadas de matriz), com um curto pulso de laser causava uma transferência de energia e processo de dessorção, produzindo íons da matriz em fase de gás. Também foi descoberto que se uma baixa concentração de um

analito não-absorbante, como uma proteína ou molécula de ácido nucléico, fosse adicionada à matriz em solução e embutida nos cristais sólidos da matriz formados por secagem da mistura, as moléculas intactas não-absorbantes do analito também seriam levadas à fase de gás e ionizadas sob a irradiação a laser, facilitando sua análise de massa (135).

Os componentes básicos de um espectrômetro de massa consistem de uma fonte de ionização (laser UV), um analisador e um detector. Para análise, a amostra biológica (mistura de ácidos nucléicos) é misturada com um material (matriz), geralmente um ácido orgânico de baixo peso molecular com forte absorção no comprimento de onda do laser, em blocos de uma superfície de silicone do chip (136). O processo MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) é então iniciado por uma dessorção a laser da mistura analito-matriz (137). Os subsequentes processos físicos resultam na predominante formação de íons carregados positivamente ou de íons carregados negativamente. Esses íons são extraídos com um campo elétrico e separados em função de suas massas moleculares e de suas cargas (136). As massas dos compostos de ácidos nucleicos são calculadas através do “tempo de vôo” (TOF), que reflete o tempo que o composto laser-ionizado e acelerado requer para ser levado através do tubo de vôo (1-2m de comprimento) do analisador TOF e alcançar o detector do instrumento. No detector, os compostos ionizados geram um sinal elétrico que permanece gravado por um sistema de dados e é finalmente convertido em um espectro de massa (137). A resolução da atual geração de espectrômetros de massa MALDI permite a fácil distinção da substituição de núcleo bases com variação de massa de 1-7 KDa (kilodalton), o que corresponde ao tamanho de DNA de 3-25 nucleobases (136). Inicialmente, MALDI-TOF MS era predominantemente aplicado para a análise de proteínas e peptídeos, e somente mais recentemente para ácidos nucleicos. Sua principal vantagem sobre os métodos convencionais de análise de DNA é a sua velocidade de aquisição de resultado do experimento e a completa automação de todos os passos, da preparação da amostra até a aquisição e processamento de dados, dando à técnica MALDI-TOF MS grande potencial para aplicações de análise de ácidos nucleicos em larga escala (135,136).

Há várias maneiras de detectar alterações e/ou mutações no genoma, as quais dependem em muitos casos, de diferentes métodos de detecção.

- **Genotipagem usando o System® MassARRAY da Sequenom, Inc. (San Diego, CA):** esse método de genotipagem é considerado de médio rendimento e permite a genotipagem de baixo custo para até 40 SNPs simultaneamente e quantidades de amostras que podem variar de 96 a 3.840 análises, em apenas dois dias. No ensaio iPLEX Gold®, juntamente com o equipamento Sequenom existe um software para o desenho dos três *primers* necessários para os ensaios com até 95% de eficiência, permitindo flexibilidade para projetar qualquer número de ensaios para uma grande variedade de alvos no genoma. O ensaio consiste em uma reação de PCR multiplex locus-específico, seguido por um PCR de extensão de uma única base que utiliza dideoxinucleotídeos de massa-modificada que se anela exatamente acima da alteração de interesse. Essas amostras são transferidas para um chip e, uma vez que as moléculas da amostra são vaporizadas e ionizadas, são transferidas eletrostaticamente para o espectrômetro de onde são separadas dos íons da matriz, individualmente detectadas com base na sua massa-carga ( $m/z$ ), e analisadas. Conforme mostra a figura 14:



**Figura 14- Esquematização da iPLEX® Gold Assay da Sequenom, Inc. (San Diego, CA), por meio da técnica MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry)**

- **Análise das alterações utilizando MassArray-System (Sequenom, Inc.):** a *Sequenom* lançou o sistema *MassArray* em 2000 como uma plataforma automatizada de genotipagem para a detecção de variações genéticas (SNPs) no genoma humano. O sistema baseado em espectrometria de massa tem se tornado uma das principais tecnologias para análises de larga-escala e medidas de alta fidelidade de variações na sequência de ácidos nucleicos (138,139). O sistema é composto por um robô (*MassArray® Liquid Handler Station*), utilizado no preparo das reações de PCR; por um dispensador de amostras (*MassArray® Nanodispenser*), utilizado na transferência dos produtos das reações de PCR para SpectroChips que são avaliados no espectrômetro de massa; e por um espectrômetro de massa (*MassArray® Compact System*), utilizado na medida das massas das moléculas associadas à matriz do SpectroChip. O sistema é acompanhado de um pacote de softwares que realizam a transferência dos dados em tempo real e geram relatórios com as informações de cada SNP para as amostras analisadas (*MassArray®Typer4.0*).

- **Definição dos ensaios:** Oligonucleotídeos de captura dos SNPs e/ou mutações (*primers* de amplificação) e oligonucleotídeos de extensão de bases únicas foram desenhados a partir das sequências selecionadas com mutações e/ou SNPs. O desenho dos ensaios foi realizado com o auxílio do software *MassArray® Assay Design* (versão 3.1, *Sequenom Inc.*, San Diego - USA). Este programa também gera os grupos de SNPs (multiplex) a serem avaliados em conjunto.

- **Amplificação dos produtos contendo os SNPs e/ou mutações:** após serem definidas as alterações, os *primers* de captura foram empregados na amplificação de produtos, variando de 100 pb a 400 pb, englobando a região que apresenta o sítio polimórfico. As amplificações foram efetuadas em um termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) com dois blocos para placas de 386 amostras, seguindo protocolo descrito pela *Sequenom (iPLEX Gold Application Guide)*. Nesta etapa os fragmentos contendo as alterações foram capturados. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 5 microlitro contendo 10 ng de DNA molde, tampão 10x, 500 µM de cada dNTP, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 nM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 5 U *HotStar Taq* DNA polimerase.

- **Tratamento com SAP:** após a reação de PCR, os produtos de amplificação passaram por um tratamento para neutralização dos dNTPs (desorribonucleotídeos trifosfatados) não incorporados, utilizando a enzima *shrimp alkaline phosphatase* (SAP). A SAP corta os fosfatos dos dNTPs não incorporados durante a reação de amplificação, convertendo-os em dNTPs não fosforilados e tornando-os inviáveis para futuras reações. Adicionou-se a cada amostra 2µL da reação de SAP, a placa foi encubada em um termociclador a 37°C durante 45 minutos para ação da enzima.

- **Reação de extensão – iPLEX:** aos produtos de amplificação tratados com a enzima SAP, foram adicionados 2µL de um coquetel de extensão (*iPLEX Gold reaction*), composto pelos *primers* de extensão, enzima (*iPLEX enzyme*), tampão (*iPLEX Buffer Plus 10x*) e nucleotídeos com massas modificadas (*iPLEX Terminator Mix*). Esta reação também ocorreu com o auxílio do termociclador citado acima. Durante a reação, o *primer* se anela exatamente adjacente ao sítio do SNP, estendendo apenas uma base (SEB - *single extended base process*). A *iPLEX Gold Reaction* produz produtos estendidos alelo-específicos de massas diferentes, dependendo do nucleotídeo que foi adicionado, ou seja, dependendo da forma alélica presente naquela amostra.

- **SpectroCHIP:** antes da reação de espectrometria de massa, os produtos das reações de *iPLEX* foram submetidos a uma purificação com uma resina (*Clean Resin*) que remove o excesso de íons, que podem interferir na leitura do laser. Foram adicionados 6mg de resina a cada poço da placa com capacidade de 384 amostras e ao volume total são acrescentados 16 µL de água para completar um volume final de 25 µL em cada amostra. As reações foram transferidas das placas de 384 para SpectroCHIPS com o auxílio do *MassArray Nanodispenser* (Sequenom Inc., San Diego – USA). O SpectroCHIP é analisado a partir do *MassArray Analyzer Compact* (Sequenom Inc., San Diego – USA), através da técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*). O processo MALDI-TOF é iniciado por uma dessorção a laser da mistura analito-matrix, sendo o analito o produto de amplificação gerado e selecionado durante a reação *iPLEX*. Os subsequentes processos físicos resultam na predominante

formação de íons carregados positivo ou negativamente. Esses íons são extraídos com um campo elétrico e separados em função de suas massas moleculares e de suas cargas. As massas dos compostos de ácidos nucleicos são calculadas através do “tempo de voo” (TOF), que reflete o tempo que o composto laser-ionizado e acelerado requer para ser levado através do tubo de voo (1-2m de comprimento) do analisador TOF e alcançar o detector do instrumento. No detector, os compostos ionizados geram um sinal elétrico que fica gravado por um sistema de dados e é finalmente convertido em um espectro de massa (139).

- **Análise dos resultados:** o software *MassArray TyperAnalyzer 4.0* acumula as informações geradas durante o processo descrito acima e fornece relatórios que descrevem todos os resultados das análises de cada uma das amostras avaliadas: genótipos e frequências são as principais informações resultantes deste sistema. Os picos foram utilizados no cálculo das frequências dos alelos das mutações.

### 3.2.2.3- Métodos de pesquisa das mutações secundárias

Oito mutações secundárias nos genes mitocondriais *MT-ND1* (gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 1), *MT-ND4L* (gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4L) e *MT-ND6* (gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 6) foram rastreadas pelo sequenciamento direto e pela Plataforma System® MassARRAY da Sequenom, nos pacientes que não apresentaram uma das 3 mutações primárias.

- **Rastreamento das mutações secundárias pelo método de sequenciamento direto.**

O rastreamento das mutações secundárias também foi realizado com o uso do *ABI prism Big Dye Terminator cycle sequencing Ready Reaction kit V 3.1* (ABI Prism/ Applied Biosystems, Foster City, CA) e analisadas no *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem). Todas as sequências foram analisadas de acordo as referências contidas no banco de dados MitoMap ([NC\\_012920](#)) (37).

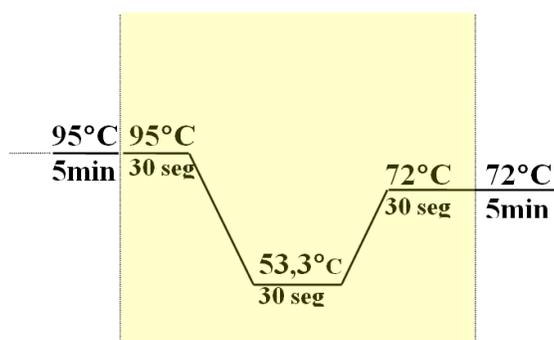
O método de amplificação das três regiões de interesse é semelhante ao usado para rastreamento das mutações primárias, alterando apenas os *primers* e as temperaturas dos ciclos:

**Região 1**-Gene *MT-ND1* - mutações G3733A e C4171A

Os *primers* para a amplificação desta região são mostrados na tabela 6 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 15.

**Tabela 6 - Sequência de primers para a amplificação da região em que foram rastreadas as mutações G3733A e C4171A no gene *MT-ND1*.**

Nome	Primers (5'→3')
<i>Primer-F</i>	GAC CCT ACT TCT AAC CTC CC
<i>Primer-R</i>	GAT TGT AAT GGG TAT GGA GAC



**Figura 15 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações G3733A e C4171A.**

**Região 2** - Gene *MT-ND4L* - mutação T10663C

Os *primers* para a amplificação desta região são descritos na tabela 7 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 16.

**Tabela 7 - Sequência de primers para a amplificação da região em que foi investigada a presença da mutação T10663C no gene *MT-ND4L*.**

Nome	Primers (5'→3')
<i>Primer-F</i>	GCT ACT CTC ATA ACC CTC AAC
<i>Primer-R</i>	GCA TTG GAG TAG GTT TAG G

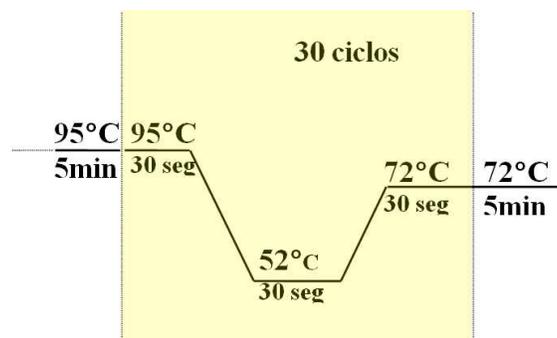


Figura 16 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T10663C.

**Região 3** - Gene *MT-ND6* - Mutações G14459A, C14482G, C14482A, A14495G e C14568T.

Os *primers* para a amplificação desta região são mostrados na tabela 8 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 17.

**Tabela 8** - Sequência de primers para a amplificação da região que foram rastreadas as mutações G14459A, C14482G, C14482A, A14495G e C14568T no gene *MT-ND6*.

Nome	Primers (5'→3')
Primer-F	CAC CAA GAC CTC AAC CC
Primer-R	GTA TGC TTT GTT TCT GTT GAG

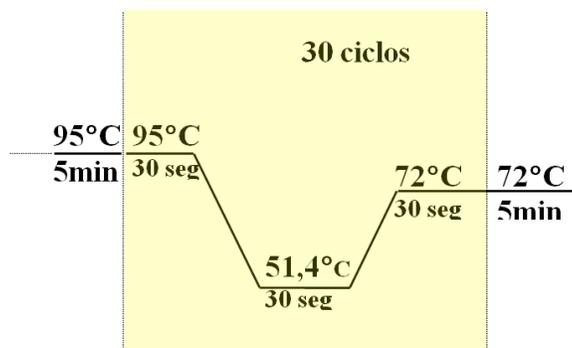


Figura 17 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações G14459A, C14482G, C14482A, A14495G e C14568T.

Após a amplificação das regiões de interesse, o método de sequenciamento direto prosseguiu com as etapas de Purificação dos produtos de PCR, Reação de sequenciamento automático para produto de PCR, Purificação e Liofilização, Colocação da placa no sequenciador e Análise das sequências obtidas. Todas essas etapas foram melhores

detalhadas anteriormente no Tópico 3.2.2.2.2 (Sequenciamento direto das mutações primárias).

**- Rastreamento das mutações secundárias usando System® MassARRAY da Sequenom.**

Para o rastreamento das oito mutações secundárias da LHON, o método foi inteiramente similar ao anteriormente descrito no rastreamento das mutações primárias usando a plataforma System® MassARRAY da Sequenom.

**3.2.2.4- Pesquisa dos haplogrupos**

Com base nos dados compilados no banco de dados MitoMap ([NC\\_012920](http://www.mitomap.org)) (37), 25 haplogrupos foram selecionados para o estudo. Para definir a qual haplogrupo os indivíduos pertenciam, foram rastreados os seus respectivos marcadores genéticos (SNPs) (Tabela9). Os pacientes portadores de uma das mutações primárias tiveram seus haplogrupos rastreados com o uso da plataforma System® MassARRAY da Sequenom.

**Tabela 9 - Haplogrupos e seus respectivos marcadores (SNPs)**

<b>A:</b>	A663G	<b>M:</b>	C10400T, A10398G
<b>B:</b>	Deleção de 9pb (8281-8269)	<b>N:</b>	C10400C, T10873T
<b>C:</b>	A13263G	<b>P:</b>	T10118C
<b>D:</b>	C5178A	<b>R:</b>	C12705C
<b>E:</b>	C13626T	<b>S:</b>	Sem marcador
<b>F:</b>	T6392C, A4732G	<b>T:</b>	A4917G
<b>G:</b>	A4833G	<b>U:</b>	A12308G
<b>H:</b>	C7028C, C14766C	<b>Uk:</b>	G9055A, A12308G
<b>I:</b>	A4529T, G1719A, T10035C	<b>V:</b>	G4580A, C14766C
<b>J:</b>	G13708A, T4216C	<b>W:</b>	A11947G, G8994A
<b>K:</b>	G9055A, A12308G	<b>X:</b>	C6371T, T14470C, G1719A
<b>L1, L2:</b>	C3594T	<b>Y:</b>	G8392A
<b>L3:</b>	C3594C	<b>Z:</b>	T9090C

Tabela modificada de <http://www.mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupFreqs>

### 3.2.3- Métodos para análise estatística dos dados

As variáveis coletadas para o estudo foram:

- Sexo;
- Idade de início da manifestação da doença;
- Morbidade bilateral simultânea ou sequencial, com respectivo tempo de acometimento entre os olhos;
- Recorrência familiar materna;
- Acuidade visual (OD-olho direito e OE-olho esquerdo), dividido em 3 grupos, para facilitar a análise estatística (20/50-20/60, 20/80-20/100, 20/200-<20/400);
- Aspecto do nervo óptico (OD=OE), cujos achados estavam simétricos em ambos os olhos e foi classificado como: normal, palidez temporal de papila ou atrofia óptica;
- Campo visual (OD e OE) – escotoma central, escotoma cecocentral ou não passível de ser realizado devido à grave perda visual (impraticável);
- Mutação- ausente ou presente e respectivo tipo.

Como o critério para a divisão dos grupos implicou numa seleção de idade e gênero, essas variáveis foram analisadas separadamente. Para análise comparativa das médias de idade de início da manifestação da doença entre os grupos I-a e I-b e também II-a e II-b, foi utilizado o teste t-student. Para efetuar a análise entre os grupos I-a, I-b, II-a e II-b em relação às variáveis categóricas da tabela 13, foi utilizado o teste de Qui-quadrado. Quando as variáveis categóricas apresentaram diferença estatisticamente significativa, foi utilizado o teste de Qui-quadrado de partição para verificar entre quais grupos estava ocorrendo esta diferença, uma vez que o Qui-quadrado de partição realiza vários testes de qui-quadrado na mesma tabela. Também foi usado o teste Exato de Fisher, uma opção para o qui-quadrado quando existe valor “1” em uma das linhas. O valor de significância adotado é igual a 5 %, ou seja, valores inferiores a 5 % (p-valor<0,05) serão considerados estatisticamente significativos. A análise foi realizada com o auxílio dos softwares livres Bioestat 5.0 e PSPP 0.7.9.



# **RESULTADOS**

---



## 4- RESULTADOS

### 4.1-Resultado Molecular

#### 4.1.1-Resultado molecular do rastreamento das mutações primárias

Foram estudados 63 pacientes não aparentados para verificar a presença e a frequência das mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A. A tabela 10 apresenta o resumo dos resultados obtidos:

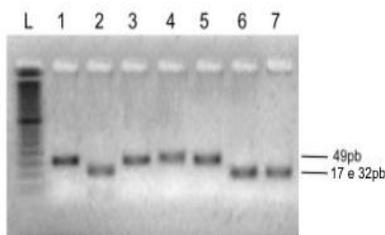
**Tabela 10 - Compilação dos resultados encontrados para rastreamento das mutações primárias usando as técnicas de PCR-RFLP e Sequenciamento direto (UNICAMP, 2013).**

Mutação	Número de pacientes	Mutações primárias (%)	Total (%)
G11778A	14	77,8	22,2
T14484C	4	22,2	6,3
G3460A	0	0	0
Sem mutação *	45	0	71,5

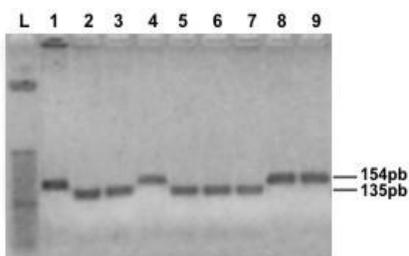
\*Pacientes nos quais não foram encontradas as mutações primárias

#### Mutações G11778A e T14484C

Dos 63 pacientes estudados, 14 deles apresentaram a mutação G11778A e 4 a mutação T14484C, todos com resultados fortemente sugestivo de homoplasmia. A análise dessas mutações foi realizada por PCR-RFLP (Figuras 18 e 19) e Sequenciamento direto.



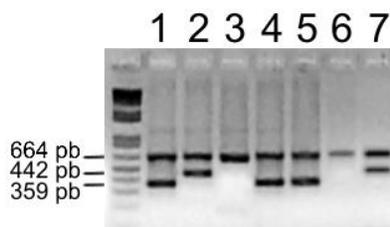
**Figura 18 - Padrão de bandas para a mutação G11778A. (L) Ladder 10 pb Invitrogen®; (1) Controle mutante; (2) Controle sem mutação; (3)-(5) indivíduos mutantes; (6), (7) indivíduos sem a mutação.**



**Figura 19 - Padrão de bandas para a mutação T14484C: (L) Ladder 100pb Invitrogen®; (1) Controle mutante; (2) controle normal; (3), (5), (6) e (7) pacientes sem mutação; (4), (8) e (9) pacientes com a mutação.**

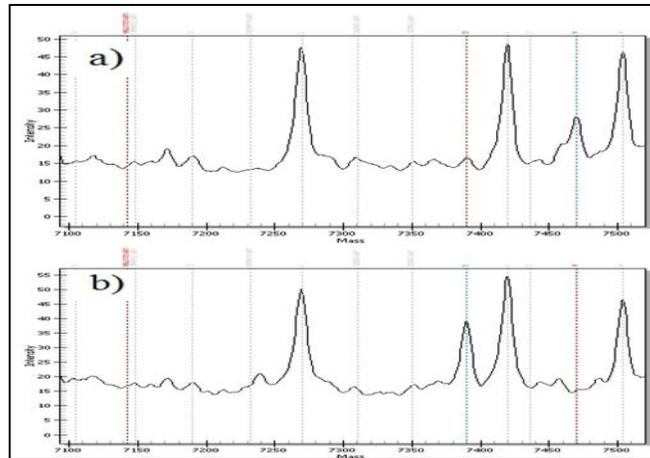
Todos os resultados foram confirmados utilizando os métodos de PCR-Multiplex e Sequenom.

A figura 20 exemplifica o padrão de bandas encontrado pelo método de PCR-Multiplex:

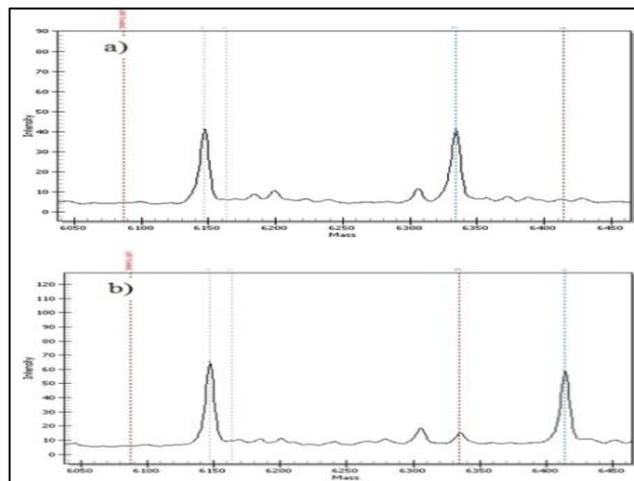


**Figura 20 - Padrão de bandas da PCR multiplex para o rastreamento das mutações primárias da LHON. (L) Ladder 100pb Invitrogen®; (1) Controle positivo G11778A; (2) Controle positivo T14484C; (3) Controle normal; (4) e (5) Pacientes mutantes para G11778A; (6) Paciente normal; Paciente mutante para T14484C.**

Os resultados usando a Plataforma Sequenom foram compatíveis com os encontrados por outras técnicas, confirmando a eficácia da técnica. A leitura dos resultados foi realizada nos gráficos gerados pelo software de análise *MassArray® Typer 4.0*, da Sequenom. Esses gráficos apresentam diferentes picos para as diferentes alterações encontradas. No caso do presente estudo, dois tipos gráficos poderiam ser encontrados para cada mutação rastreada, um para a amostra do indivíduo normal e outro para o mutante. As figuras 21 e 22 mostram esses resultados:



**Figura 21 - Padrão gráfico gerado pelo software MassArray® Typer 4.0 no rastreamento da mutação primária G11778A. Pico apontado pela linha tracejada azul indica qual a base identificada pela plataforma Sequenom. a) Indivíduo mutante / b) Indivíduo normal.**



**Figura 22 - Padrão gráfico gerado pelo software MassArray® Typer 4.0 no rastreamento da mutação primária T14484C. Pico apontado pela linha tracejada azul indica qual a base identificada pela plataforma Sequenom. a) Indivíduo mutante / b) Indivíduo normal.**

### **Mutação G3460A**

O rastreamento da mutação primária G3460A foi realizado usando as técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento direto.

Dos 63 pacientes estudados nenhum deles apresentou a mutação G3460A.

O mesmo resultado foi observado quando as amostras dos indivíduos foram submetidas ao rastreamento utilizando o PCR-Multiplex e a Plataforma Sequenom.

#### 4.1.2–Resultado molecular do rastreamento das mutações secundárias

Nenhum dos 45 pacientes rastreados para a detecção de mutações secundárias apresentou quaisquer das 8 mutações secundárias pesquisadas. Esses indivíduos tiveram seus fragmentos de interesse amplificados e posteriormente submetidos ao sequenciamento direto e ao rastreamento pela plataforma Sequenom, para detecção das mutações secundárias.

#### 4.1.3 – Resultado dos haplogrupos dos indivíduos mutantes

Neste estudo, foram encontrados 18 pacientes mutantes entre os 63 pacientes com neuropatia óptica. Os haplogrupos destes pacientes foram rastreados pela técnica da Plataforma Sequenom, cujos resultados são mostrados na tabela 11.

**Tabela 11- Haplogrupos dos indivíduos com mutação para LHON (UNICAMP, 2013).**

Mutações	Haplogrupos				
	L1/L2	L3	L3, C e M	L3 e U	L3, D e M
G11778A	6	3	3	1	1
T14484C	1	2	0	1	0

Os haplogrupos encontrados foram: L1/L2, L3, C, D, M e U. Entre os 14 mutantes G11778A foram encontrados haplogrupos nas seguintes frequências: 6 pacientes com haplogrupos L1/L2, 3 com L3, 3 com L3, C e M, 1 com L3 e U, 1 com L3, D e M. Os 4 mutantes T14484C apresentaram os haplogrupos nas frequências: 1 paciente com haplogrupo L1/L2, 2 com L3 e 1 com L3 e U.

#### 4.1.4 – Resultado molecular do grupo controle

Os 32 pacientes do grupo controle não apresentaram quaisquer das mutações primárias ou secundárias rastreadas.

## 4.2- Resultados da análise das variáveis clínicas

### 4.2.1- Resultado da análise dos 63 pacientes com neuropatia óptica

#### Dados referentes ao gênero

Dos 63 pacientes com neuropatia óptica estudados, 54 pacientes eram masculinos (85.7%) e 9 femininos (14.3%). Entre os pacientes femininos, 7 eram do grupo II-a e 2 do grupo II-b. Os dados referentes ao gênero não foram analisados estatisticamente uma vez que o gênero do paciente foi critério para a formação dos grupos, pois para pertencer ao grupo I-a e I-b, todos deveriam pertencer ao gênero masculino.

#### Variável idade de início de manifestação da doença

Com relação à variável idade de início de manifestação da doença, a análise foi realizada apenas intragrupo, ou seja, I-a x I-b e II-a x II-b, uma vez que esta variável foi usada como critério para a formação dos grupos. A idade máxima de início da manifestação da doença estabelecida para pertencer aos grupos I-a e I-b foi de 30 anos. Para esta análise foi utilizado o teste t-student, comparando a média de idade de início da manifestação da doença entre os grupos I-a e I-b e, depois, o mesmo foi feito para comparar os grupos II-a e II-b, conforme dados das tabelas 12 e 13.

**Tabela 12 - Média de idade de início da manifestação da doença entre os portadores de neuropatia óptica nos grupos I-a e I-b (UNICAMP, 2013).**

Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Erro padrão	p-valor
I-a	17	17,706	5,277	1,280	0,010
I-b	8	23,875	4,883	1,726	

As médias de idade de início da manifestação da doença dos grupos I-a e I-b diferiram estatisticamente, ou seja, a média de idade do início da manifestação da doença em pacientes do grupo I-a é menor do que a do grupo I-b.

**Tabela 13 - Média de idade de início da manifestação da doença entre os portadores de neuropatia óptica nos grupos II-a e II-b (UNICAMP, 2013).**

Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Erro padrão	p-valor
II-a	7	30,143	15,700	5,934	0,008
II-b	31	40,968	7,167	1,287	

As médias de idade de início da manifestação da doença dos grupos II-a e II-b também diferiram estatisticamente, ou seja, a média de idade do início da manifestação da doença em pacientes do grupo II-a é menor do que a do grupo II-b.

A tabela 14 resume as demais variáveis analisadas: manifestação da perda visual bilateral, simultânea ou sequencial, recorrência familiar de linhagem materna, acuidade visual OD e OE, nervo óptico (descritos OD e OE conjuntamente, pois os achados foram simétricos entre os olhos), campo visual OD e OE e a presença ou ausência de mutação.

**Tabela 14 - Dados descritivos das variáveis categóricas em relação aos grupos I-a, I-b, II-a e II-b de portadores de neuropatia óptica (UNICAMP, 2013), seguidos do resultado do teste de Qui-quadrado.**

Variável		GRUPO				Total	Total (%)	p-valor
		I-a	I-b	II-a	II-b			
Bilateral	Simultâneo	11	5	5	28	49	78%	0,125
	Sequencial	6	3	2	3	14	22%	
Recorrência familiar	Sim	10	4	3	6	23	37%	0,040
	Não	7	4	4	25	40	63%	
Acuidade visual - OD	20/50 e 20/60	1	1	3	11	16	25%	0,161
	20/80 e 20/100	4	1	2	3	10	16%	
	20/200 e ≤20/400	12	6	2	17	37	59%	
Acuidade visual - OE	20/50 e 20/60	1	1	2	9	13	21%	0,228
	20/80 e 20/100	3	1	3	7	14	22%	
	20/200 e ≤20/400	13	6	2	15	36	57%	
Nervo óptico - OD/OE	Palidez temporal	13	5	4	22	44	70%	0,518
	Atrofia óptica	4	3	3	6	16	25%	
	Normal	0	0	0	3	3	5%	
Campo visual - OD	Central	5	6	2	18	31	49%	0,039
	Cecocentral	7	2	5	11	25	40%	
	Impraticável	5	0	0	2	7	11%	
Campo visual - OE	Central	3	5	1	16	25	40%	0,033
	Cecocentral	9	3	6	11	29	46%	
	Impraticável	5	0	0	4	9	14%	
Mutação	Presente	10	4	1	3	18	29%	0,001
	Ausente	7	4	6	28	45	71%	

As variáveis que diferiram estatisticamente, de acordo com o teste de qui-quadrado, foram: recorrência familiar de linhagem materna, campo visual, tanto para OD quanto para OE, presença de mutação (independente do tipo de mutação), com valor de p inferior a 0,05.

### Variável recorrência familiar materna

A análise da variável recorrência familiar, de acordo com o teste de qui-quadrado, mostrou que os grupos diferiram entre si com p-valor de 0,040, conforme dados da tabela 15.

**Tabela 15 - Comparação da variável recorrência familiar entre os quatro grupos de pacientes com neuropatia óptica (UNICAMP, 2013).**

Variável		GRUPO				Total	Total (%)	p-valor
		I-a	I-b	II-a	II-b			
Recorrência familiar	Sim	10	4	3	6	23	37%	<b>0,040</b>
	Não	7	4	4	25	40	63%	

O teste de qui-quadrado de partição mostrou que os grupos I-a, I-b e II-a diferiram estatisticamente quando comparados com o grupo II-b.

### Variável campo visual

Em relação à variável campo visual tanto do OD como OE, também houve diferença estatisticamente significativa no teste de qui-quadrado, com p-valor de 0,039 para OD e 0,033 para OE, conforme dados descritos na Tabela- 16.

**Tabela 16 - Comparação da variável campo visual de OD e OE entre os quatro grupos de pacientes com neuropatia óptica (UNICAMP, 2013).**

Variável		GRUPO				Total	Total (%)	p-valor
		I-a	I-b	II-a	II-b			
Campo visual - OD	Central	5	6	2	18	31	49%	<b>0,039</b>
	Cecocentral	7	2	5	11	25	40%	
	Impraticável	5	0	0	2	7	11%	
Campo visual - OE	Central	3	5	1	16	25	40%	<b>0,033</b>
	Cecocentral	9	3	6	11	29	46%	
	Impraticável	5	0	0	4	9	14%	

Existe associação entre os grupos I-a e I-b, de acordo com o teste de qui-quadrado de partição, ou seja, pacientes que pertencem a estes grupos apresentam os mesmos resultados para os exames realizados. Há diferença estatisticamente significativa quando os grupos I-a e I-b são comparados com os outros grupos.

### Total de mutações

Ao considerar o total de mutações entre os 63 pacientes com neuropatia óptica, independente do tipo de mutação, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, de acordo com o teste de qui-quadrado, conforme exposto na tabela 17.

**Tabela 17 - Comparação da variável mutação entre os quatro grupos de pacientes com neuropatia óptica (UNICAMP, 2013).**

Variável		GRUPO				Total	Total (%)	p-valor
		I-a	I-b	II-a	II-b			
Mutação	Presente	10	4	1	3	18	29%	0,001
	Ausente	7	4	6	28	45	71%	

Aplicando o teste de partição, temos que os grupos I-a e I-b não diferiram estatisticamente entre si, com p-valor de 0,678 (tabela 18). Quando comparados os grupos II-a e II-b, utilizando o teste exato de Fisher (uma opção para o qui-quadrado, pois existe valor “1” em uma das linhas), os mesmos também não diferiram, com p-valor de 0,984 (tabela 19). Segundo o teste de partição, os grupos I-a e I-b diferiram estatisticamente do grupo II-a e II-b.

**Tabela 18 - Comparação da frequência de mutação dos grupos I-a x I-b de pacientes com diagnóstico clínico da LHON (UNICAMP, 2013).**

Variável		GRUPO		Total	Total (%)	p-valor
		I-a	I-b			
Mutação	Sim	10	4	14	56%	0,678
	Não	7	4	11	44%	

**Tabela 19 - Comparação da frequência de mutação dos grupos II-a x II-b de pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer (UNICAMP, 2013).**

Variável		GRUPO		Total	Total (%)	p-valor
		II-a	II-b			
Mutação	Sim	1	3	4	11%	0,984
	Não	6	28	34	89%	

O grupo I (a+b) diferiu estatisticamente do grupo II (a+b), na análise do teste de qui-quadrado (tabela 20).

**Tabela 20 - Comparação da frequência de mutação dos grupos I(a+b) e II(a+b) (UNICAMP, 2013).**

Variável		GRUPO		Total	Total (%)	p-valor
		I-a/b	II-a/b			
Mutação	Sim	14	4	18	29%	0,000
	Não	11	34	45	71%	

De acordo com o teste de qui-quadrado, a proporção dos pacientes que sofreram mutação em relação aos grupos I e II diferiram estatisticamente, ou seja, a proporção de mutações depende do grupo ao qual pertence.

### **Bilateralidade do acometimento visual**

Quanto à bilateralidade do acometimento visual, o resultado encontrado não foi estatisticamente significativo ao comparar os pacientes dos 4 grupos. Dos 63 pacientes, 49 (78%) tiveram perda visual simultânea e 14 (22%), sequencial. Na bilateralidade sequencial o tempo médio (em dias) dos grupos I-a, I-b, II-a e II-b foram respectivamente 48.5, 24.67, 639 e 191.67 dias.

### **Acuidade visual e aspecto do nervo óptico**

As variáveis, acuidade visual e aspecto do nervo óptico, não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos dos 63 pacientes com neuropatia óptica.

#### 4.2.2- Resultado da análise dos 18 pacientes com mutação mitocondrial da LHON, confirmado pelo teste molecular.

As variáveis estudadas nos 18 pacientes mutantes não puderam ser comparadas estatisticamente entre os quatro grupos I-a, I-b, II-a e II-b, devido ao número insuficiente da amostra em alguns grupos. As variáveis foram analisadas estaticamente pelo teste do Qui-quadrado/ teste exato de Fisher comparando dois grupos I (a+b) x II (a+b), para verificar se havia diferenças significativas entre os mutantes com quadro clínico clássico de LHON e mutantes que a priori tinham o diagnóstico de neuropatia óptica de etiologia a esclarecer (tabela 21).

**Tabela 21 - Dados descritivos das variáveis categóricas em relação aos mutantes dos grupos I e II, seguidos do resultado do teste de Qui-quadrado / Exato – Fisher (UNICAMP, 2013).**

Variável		GRUPO		Total	Total (%)	p-valor
		I	II			
Bilateral	Simultâneo	8	3	11	61.11	<b>0.518</b>
	Sequencial	6	1	7	38.89	
Recorrência familiar	Sim	10	4	14	77.78	<b>0.225</b>
	Não	4	0	4	22.22	
Acuidade visual - OD	20/100	1	0	1	5.56	<b>0.582</b>
	20/200 e ≤20/400	13	4	17	94.44	
Acuidade visual - OE	20/100	1	0	1	5.56	<b>0.582</b>
	20/200 e ≤20/400	13	4	17	94.44	
Nervo óptico - OD/OE	Palidez temporal	7	1	8	44.44	<b>0.375</b>
	Atrofia óptica	7	3	10	55.56	
Campo visual - OD	Central	6	0	6	33.33	<b>0.276</b>
	Cecocentral	4	2	6	33.33	
	Impraticável	4	2	6	33.33	
Campo visual - OE	Central	4	0	4	22.22	<b>0.448</b>
	Cecocentral	6	2	8	44.44	
	Impraticável	4	2	6	33.33	
Mutação	T14484C	3	1	4	22.22	<b>0.880</b>
	G11778A	11	3	14	77.78	

De acordo com o teste de Qui-quadrado / Exato de Fisher, os grupos I e II não apresentaram diferença estatisticamente significativa para as variáveis citadas (p-valor  $\geq$  0,05 em todos os casos). Neste caso, de acordo com os dados, os grupos mostram comportamento semelhante quanto às variáveis do estudo.

A seguir, apresenta-se a tabela 22 que compila os resultados encontrados nos indivíduos com neuropatia óptica de Leber confirmada pela análise genética molecular, inclusive com os haplogrupos relacionados. A análise descritiva dos resultados das variáveis dos 18 pacientes mutantes será realizada na mesma sequência da descrição dos resultados dos 63 pacientes com neuropatia óptica.

Tabela 22 - Resumo dos resultados das variáveis analisadas nos 18 pacientes com mutação para LHON (UNICAMP, 2013).

Pacientes/grupo	Gênero	Idade	Bilateral	Recorrência familiar Materna	Acuidade visual	Nervo óptico	Campo visual Od/Oe	Mutação	Haplogrupos
JASN / I-a	M	11	Simultâneo	+	Od20/100 Oe20/200	Palidez temporal	Central Central	T14484C	L1/L2
GAQC / I-a	M	14	sequencial, 1 semana	+	Od<20/400 Oe20/100	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A	L1/L2
AAL / I-a	M	29	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	impraticável impraticável	G11778A	L3
PSR / I-a	M	15	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A	L1/L2
LSA / I-a	M	15	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	Central cecocentral	G11778A	L3, C e M
NDO / I-a	M	19	sequencial, 2 meses	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	cecocentral cecocentral	G11778A	L3 e U
RAO / I-a	M	19	sequencial, 1 mês	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	T14484C	L3 e U
LD / I-a	M	16	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	impraticável impraticável	T14484C	L3
EDV / I-a	M	25	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	cecocentral cecocentral	G11778A	L1/L2
RCS / I-a	M	19	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	Central cecocentral	G11778A	L1/L2
EWN / I-b	M	27	sequencial, 2 meses	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	Central central	G11778A	L1/L2
USS / I-b	M	27	sequencial, 1 semana	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	Central central	G11778A	L3, C, M
LRB / I-b	M	17	sequencial, 1 semana	-	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A	L1/L2
RCV / I-b	M	17	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	Central central	G11778A	L3, D, M
ZSC / II-a	F	28	sequencial, 3 anos	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A	L3
AAGS / II-b	M	43	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A	L3
VLS / II-b	M	47	simultâneo	+	Od20/200 Oe20/200	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	T14484C	L3
RSO / II-b	M	35	Simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A	L3, C e M

M- Masculino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

Dos 18 pacientes mutantes, apenas um era do **gênero** feminino e pertencia ao grupo II-a (5,6%) os demais 17 (94,4%) eram do gênero masculino.

A **idade de início da manifestação da perda visual** ocorreu entre 11 e 47 anos, com média de 23,5 anos, sendo que apenas três pacientes manifestaram a doença após os 30 anos (35,43 e 47anos). Estes três pacientes correspondem aos mutantes do grupo II-b, pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer e antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.

A variável **recorrência familiar** esteve presente em 14 (77,8%) dos 18 pacientes com mutação, apenas 4 (22,2%) não tinham antecedente de recorrência familiar de linhagem materna. Todos os quatro pacientes mutantes do grupo II (a+b), isto é, pacientes com neuropatia óptica a esclarecer apresentaram recorrência familiar.

Seis dos 18 pacientes mutantes não conseguiram realizar o exame de **campo visual** em ambos os olhos (AO). Quatro pacientes tinham escotoma central em AO, 2 pacientes apresentam escotoma central em OD e cecocentral em OE e 6 pacientes mostravam escotomas cecocentraes em AO. O exame de campo visual não foi realizado por 4 dos 10 pacientes mutantes do grupo I-a e em 2 dos 3 pacientes mutantes do grupo II-b.

A distribuição dos 18 pacientes mutantes entre os grupos é a que se segue na tabela 23.

**Tabela 23- Frequência das mutações nos 4 grupos de mutantes para LHON (UNICAMP, 2013).**

<b>Mutação</b>	<b>I-a</b>	<b>I-b</b>	<b>II-a</b>	<b>II-b</b>	<b>total</b>	<b>%</b>
<b>G11778A</b>	7	4	1	2	14	77,8
<b>T14484C</b>	3	0	0	1	4	22,2
<b>G3460A</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Secundárias</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	10	4	1	3	18	100

O grupo I-a apresentou 10 pacientes mutantes, sendo 7 com a **mutação** G11778A e 3 com a mutação T14484C. No grupo I-b todos os 4 mutantes apresentaram a mutação G11778A, enquanto no grupo II-a a única paciente mutante tinha a mutação G11778A. Os 3 pacientes mutantes do grupo II-b apresentaram as mutações G11778A (2 pacientes) e T14484C (1 paciente).

Quanto à forma de acometimento **bilateral** da visão, 11 (61,1%) manifestaram a perda visual de forma simultânea e 7 (38,9%) de forma sequencial. Dentre os 14 mutantes com quadro clínico típico de LHON, que pertenciam ao grupo I (a+b), 8 (57,1%) tiveram perda visual de forma simultânea e 6 (42,9%) de forma sequencial, com diferença média de manifestação da perda visual entre os olhos de 28,5 dias, com desvio padrão de 26 dias. Dentre os 4 mutantes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, apenas a paciente mutante do grupo I-a teve manifestação da perda visual de forma sequencial, com uma diferença de 3 anos (~1095 dias) entre os olhos.

Com relação à variável **acuidade visual**, dos 18 pacientes mutantes 15 tinham como melhor acuidade visual corrigida, visão menor que 20/400 em ambos os olhos, um tinha visão de OD <20/400 e OE 20/100, outro tinha visão de OD 20/100 e OE 20/200 e o terceiro, 20/200 em AO.

Em relação ao aspecto do **nervo óptico**, 9 pacientes mutantes apresentavam palidez temporal do disco óptico e 9 tinham atrofia óptica.

#### **4.2.3- Resultado da análise do grupo controle**

O grupo controle foi composto por 32 indivíduos, sendo 4 do sexo feminino (12,5%) e 28 do sexo masculino (87,5%). Todos tinham história de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool e função visual preservada. A acuidade visual corrigida de todos eles foi maior ou igual a 20/30 para longe e J1 para perto em ambos os olhos, com fundo de olho, visão de cores e campo visual dentro da normalidade. Os exames laboratoriais estavam todos normais e nenhum deles apresentava sinais e/ou sintomas neurológicos. As mutações pesquisadas, primárias e secundárias, estavam ausentes em todos os 32 indivíduos do grupo controle.

# **DISCUSSÃO**

---



## 5-DISCUSSÃO

A Neuropatia óptica hereditária de Leber, descrita há mais de um século pelo oftalmologista alemão Theodor Leber, permanece como uma patologia com muitas perguntas a serem respondidas. A eclosão de pesquisas bioquímicas e moleculares ocorreu somente nos últimos 25 anos, desde quando Wallace e colaboradores publicaram na revista Science a descoberta da primeira mutação de ponto no DNA mitocondrial a ser associada com doença humana, a mutação G11778A. A partir de então, o padrão de herança não mendeliano foi elucidado e a mutação G11778A passou a ter seu valor histórico. O quadro clínico clássico está bem elucidado, assim como, a transmissão materna da doença e o fato de três principais mutações estarem relacionadas ao maior risco de expressão fenotípica desta doença. LHON é a doença mitocondrial mais frequente na população caucasóide, mas difere das demais doenças do DNA mitocondrial por acometer quase que exclusivamente o nervo óptico, mais especificamente as células p-ganglionares da retina, e por estar em homoplasmia na grande maioria dos casos. A penetrância incompleta e a preferência pelo gênero masculino falam a favor da existência de fatores genéticos, mitocondriais e nucleares, assim como, fatores epigenéticos e ambientais modulando a expressão fenotípica da doença. No entanto, muitos estudos relacionados a estes fatores e a fisiopatologia da LHON estão incompletos e parcialmente explicados. Não há relato na literatura, até o momento, de outro estudo neste país que tenha por objetivo estudar a prevalência de mutações da LHON em indivíduos não consanguíneos, fazendo a correlação entre o quadro clínico (fenótipo) e os achados moleculares (genótipo).

### **Discussão dos resultados moleculares.**

Foram estudados 63 pacientes não aparentados, com neuropatia óptica, para verificar a presença e a frequência das mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A. Pela análise molecular, foi diagnosticado a presença de 18 pacientes mutantes, portadores de uma das 3 mutações primárias. Catorze deles apresentaram a mutação G11778A e 4 a mutação T14484C, todos com resultados fortemente sugestivos de homoplasmia. A mutação primária G3460A não foi encontrada em nenhum dos pacientes estudados. O achado exclusivo de mutações primárias está parcialmente de acordo com dados descritos na literatura, onde 90 a 95% dos pacientes com LHON possuem uma das três mutações

primárias, as quais estão relacionadas a um maior risco de expressão fenotípica da doença (45).

A frequência de mutações primárias observada foi de 77,8% para a mutação G11778A e 22,2% para a mutação T14484C. Dados na literatura relatam frequência média na população mundial de 69% da mutação G11778A, 14% da mutação T14484C e 13% da mutação G3460A (45,47). Esta diferença na frequência das mutações primárias encontradas em relação à frequência relatada na literatura pode ser explicada pela composição étnica da população brasileira, formada por indivíduos de diferentes origens: africana, asiática e europeia. Além disto, a média das frequências das mutações primárias relatadas na literatura não reflete a população mundial propriamente dita, pois muitos países, dentre eles o Brasil, ainda não apresentam estudos relacionados à prevalência das mutações da LHON em sua população.

Ao analisar os dados acima, observa-se a frequência de 77,8% da mutação G11778A encontrada neste estudo foi 8,8% maior que a frequência relatada na população mundial, de 69% dos casos da LHON. No entanto, relatos destas frequências podem variar em populações específicas, provavelmente por depender da composição étnica de seus indivíduos como: 50% dos casos na Europa, 69% na Finlândia e quase 95% na população asiática (21,46,47,140).

A frequência de 22,2% da mutação T14484C encontrada entre os indivíduos mutantes deste estudo também foi maior (8,2%) que a frequência média na população mundial descrita na literatura (50,51). Fato relevante é que esta mutação T14484C, como resultado de um efeito fundador, é a mutação mais comum (87%) entre indivíduos canadenses descendentes de franceses. O efeito fundador é observado quando uma mutação no gene ocorre em alta frequência em uma população específica devido à presença da mutação decorrer de um único ancestral ou pequeno número de ancestrais (52). Esta mutação é encontrada com baixíssima frequência (1,1%) na população chinesa (141).

Nenhum dos 18 pacientes mutantes deste estudo apresentou a mutação G3460A. Embora esta mutação seja a menos frequente na população mundial, ocorrendo em 13% dos pacientes, a diferença neste caso foi bastante significativa, pois seguindo esta frequência seria esperado encontrar pelo menos 2 indivíduos com esta mutação (53,54). A ausência da mutação G3460A neste grupo de pacientes pode ser explicada não só pelas

diferenças étnicas do grupo em questão como também pela amostra relativamente pequena. Um estudo futuro, com maior número de pacientes talvez possa detectar esta mutação.

É fortemente sugestivo que os 18 pacientes mutantes estejam em homoplasmia, pois nas técnicas de PCR-RFLP, sequenciamento direto e Sequenom não foram detectados bandas ou picos adicionais no gel de agarose, eletroferograma e gráficos, respectivamente. Portanto, não foi necessário realizar a técnica do PCR real-time para detecção da taxa de heteroplasmia. Outra técnica que pode ser proposta para analisar a taxa de heteroplasmia é a Plataforma Sequenom. Nesta padronização para análise da taxa de heteroplasmia, pode-se diluir o DNA mitocondrial mutante em diversas proporções, para verificar qual a menor proporção de heteroplasmia pode ser detectada (138,139). O resultado deste estudo está concordante com a literatura, na qual é descrito que a maioria das linhagens de LHON também está em homoplasmia, a partir de amostras obtidas do sangue periférico (91). Teoricamente, no entanto, existe a possibilidade de que taxas de heteroplasmia possam ser encontradas no nervo óptico (órgão alvo) destes mesmos indivíduos, a despeito da homoplasmia encontrada em tecidos mais acessíveis, como o sangue periférico (45). Um teste pré-sintomático em indivíduos com mutação em homoplasmia para LHON, se mostra desnecessário (44,86,87). Sugere-se que a heteroplasmia possa colaborar com a penetrância incompleta da LHON, e segundo esta teoria, a expressão fenotípica de uma mutação no mtDNA depende das proporções relativas de mtDNA mutante e normal, e as consequências deletérias da maioria das mutações mitocondriais na OXPHOS geralmente aparecem quando a proporção de DNA mitocondrial mutante excede 60 a 80% do DNA mitocondrial total (25,26,27). Em 2001, Chinnery e colaboradores, da Universidade de Newcastle, analisaram 17 linhagens europeias independentes portadoras da mutação G11778A em heteroplasmia e observaram que: a frequência de cegueira em indivíduos masculinos estava relacionada à taxa de mutação encontrada no sangue periférico, mães com 80% ou menos de mtDNA mutante no sangue periférico tinham menor probabilidade de filhos afetados do que mães com 100% de mtDNA (87). Outro estudo relacionado à heteroplasmia em mutantes portadores da mutação G11778A foi realizado em 30 famílias asiáticas tailandesas, 19 (63%) em homoplasmia e 11 (37%) em heteroplasmia, comparando indivíduos sintomáticos e assintomáticos. Verificou-se que os pacientes com taxa de mutação no sangue periférico superior a 75% tinham maior chance de perda visual que

mutantes com menos que 75%, porém a gravidade da perda visual foi a mesma nestes indivíduos em heteroplasmia quando comparada aos indivíduos em homoplasmia e o efeito da heteroplasmia na expressão clínica da doença não pareceu estar ligado ao gênero ao qual o paciente pertence (142). A prevalência de heteroplasmia entre linhagens tailandesas da LHON com a mutação G11778A é similar a de outras populações asiáticas (143) e com frequência maior quando comparado às populações brancas, européias (86, 87, 142,143).

Os 45 pacientes com neuropatia óptica que não apresentaram uma das 3 mutações primárias no teste molecular, foram rastreados para a detecção de mutações secundárias. Nenhum deles apresentou quaisquer das 8 mutações secundárias pesquisadas. As mutações secundárias são raras e correspondem a 5% dos casos de neuropatia óptica hereditária de Leber (4). Portanto, neste grupo de 45 pacientes esperava-se encontrar pelo menos 2 pacientes com mutação secundária, caso todo mtDNA tivesse sido sequenciado. No entanto, foram rastreadas 8 das principais mutações secundárias dentre um grande número de mutações secundárias descritas até hoje. Provavelmente, não foram pesquisadas regiões dos genes onde outras delas pudessem ser encontradas. O número de mutações relacionadas à LHON é controverso na literatura científica, pois publicações recentes trazem novas mutações associadas à LHON em genes que expressam as subunidades dos complexos respiratórios I, III, IV e V da cadeia respiratória mitocondrial (144). Achilli e colaboradores sequenciaram em 2012, todo o genoma mitocondrial de pacientes da Itália, França e Alemanha, com suspeita de LHON, os quais não apresentavam uma das 3 mutações primárias. Eles encontraram novas mutações patogênicas raras da LHON nos genes *MT-ND 1* (G3700A, G3733A e C4171A), *MT-ND4L* (T10663C) e *MT-ND6* (G14459A, A14495A, C14482A e C14568C) e sugeriram que estas mutações passem a ser rotineiramente testadas em todos os pacientes com LHON que não apresentam uma das 3 principais mutações (145). Estudo de Lei Shu e colaboradores, sequenciou todo o genoma mitocondrial de indivíduos de 2 famílias chinesas não relacionadas portadoras da mutação G11778A. Encontraram na Família 1 duas mutações ainda não relatadas do gene *MT-ND1*(C3497T e C3571T) e na família 2, duas mutações, A10398G, no gene *MT-ND3* e T14502C, no gene *MT-ND6*. Os autores sugeriram que estas mutações secundárias possam influenciar o complexo I da cadeia respiratória, alterando a respiração celular, levando a apoptose das células ganglionares e atrofia óptica. Outra sugestão deste estudo é que as

mutações secundárias também sejam consideradas no aconselhamento genético (141). Segundo o maior Banco de Dados online sobre a LHON, o MITOMAP, mais de 30 mutações são atualmente relacionadas à doença (<http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON>) (37). No entanto, as mutações secundárias não têm, até o momento, um papel definido na etiologia da neuropatia óptica, e talvez possam atuar como as mutações primárias, deflagrando a perda visual, ou influenciem na progressão da doença, ou podem ser marcadores polimórficos de diferentes haplogrupos (45).

Dos 63 pacientes com neuropatia óptica 18 apresentaram mutação para LHON, sendo que 14 tinham a descrição clássica da doença e 4 tinham neuropatia óptica de etiologia a esclarecer. Os demais 45 pacientes não apresentaram quaisquer das mutações primárias e secundárias rastreadas. Destes últimos, 11 tinham diagnóstico clínico de LHON, pois apresentavam o quadro clínico clássico da doença e 34 tinham neuropatia óptica de etiologia a esclarecer. Nos 11 pacientes com quadro clínico clássico da LHON que não apresentaram mutação, esta possibilidade não está descartada, uma vez que seria necessário sequenciar todo o mtDNA para rastrear todas as mutações possíveis, já relatadas, ou novas mutações a serem descobertas. Os 4 pacientes com neuropatia óptica a esclarecer que apresentaram mutação para LHON, tiveram seu quadro clínico elucidado. No entanto, 34 pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer permanecem sem diagnóstico etiológico definido. Podem ter uma mutação para LHON ainda não investigada ou podem ser portadores de outras neuropatias ópticas adquiridas ou hereditárias, como a Neuropatia Óptica Autossômica Dominante (4). Várias causas de neuropatias ópticas adquiridas como isquêmicas, infecciosas, inflamatórias, desmielinizantes, carenciais, traumáticas, expansivas, já foram descartadas pelos critérios de exclusão deste estudo. É importante ressaltar que LHON deve fazer parte do diagnóstico diferencial de todos os casos de neuropatia óptica bilateral, simultânea ou sequencial, independente da idade de manifestação, principalmente em indivíduos do sexo masculino (21,63,64).

Os haplogrupos encontrados nos 18 pacientes mutantes foram: L1/L2, L3, C, D, M e U, sendo L1/L2 e L3, os mais frequentes. Entre os 14 mutantes G11778A foram encontrados haplogrupos L1/L2, L3, C, D, M e U. Os 4 mutantes T14484C apresentaram os

haplogrupos: L1/L2, L3 e U. Estudos recentes relatam os haplogrupos encontrados em diferentes populações, assim como o maior ou menor risco de expressão fenotípica da LHON nos indivíduos mutantes. Verifica-se que os indivíduos com ancestrais europeus pertencem a um dos nove seguintes haplogrupos: H, I, J, K, T, U, V, W e X, com cerca da metade dos casos pertencentes ao haplogrupo H (38,39,88,89). Entre os asiáticos, chineses e tailandeses portadores da mutação G11778A, foram relacionados os seguintes haplogrupos: B4a, B5, C, D4, D5, F1, M1, M7b, M8a, M10a e N9a (91,93). Na população iraniana foi verificada associação entre as mutações G11778A e G3460A com os haplogrupos J e W, respectivamente (94). O único estudo realizado, até o momento, na população brasileira encontrou o haplogrupo J em uma grande linhagem de LHON portadora da mutação G11778A, com ancestral materno de origem italiana (95).

Comparando os resultados do presente estudo com dados da literatura acima citados (38,39,88,89,91,93,94), o haplogrupo L e seus subhaplogrupos não foram encontrados em nenhuma das populações anteriormente estudadas. No entanto, avaliando o mapa da história da migração dos haplogrupos do mtDNA humano, L1,L2 e L3 derivam do primeiro haplogrupo africano L0, o qual foi a origem de todos os demais haplogrupos, há cerca de 150.000 anos. Os haplogrupos L1 e L2 são praticamente um único, sendo que o marcador para o rastreamento destes haplogrupos é o mesmo. O haplogrupo U reflete um ancestral comum europeu, enquanto que os haplogrupos C, D e M, refletem um ancestral comum asiático (2).

O trabalho mostra que este grupo de pacientes é composto por indivíduos descendentes de asiáticos, europeus e principalmente africanos, refletindo a população brasileira a qual é bastante miscigenada. No entanto, não foi possível correlacionar os haplogrupos identificados neste estudo ao maior ou menor risco de expressão do fenótipo nos indivíduos com mutação para LHON, pois seria necessário fazer um estudo das linhagens de cada um dos 18 mutantes, assim como comparar os resultados com estudo de linhagens controle da população em estudo (95).

Os 32 pacientes do grupo controle tinham história de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool e função visual preservada e não apresentaram quaisquer das mutações primárias ou secundárias rastreadas. Este achado foi válido e permitiu associar a mutação apenas aos doentes. Este resultado está concordante com a literatura a qual descreve que

uma porcentagem substancial da população faz uso abusivo do tabaco e do álcool e relativamente poucos manifestam a perda visual (130).

### **Discussão dos resultados das análises das variáveis clínicas**

Dos 63 pacientes com neuropatia óptica estudados, 54 pacientes pertenciam ao gênero masculino (85.7%) e 9 ao feminino (14.3%). No grupo II-b, isto é, pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer e com histórico de consumo abusivo de tabaco e álcool (NOTA), dos 31 pacientes 2 eram femininos e 29 masculinos. Este achado está de acordo com a literatura, que descreve a Neuropatia Óptica Tabaco Álcool, como uma patologia muito semelhante à LHON, inclusive a predileção pelo sexo masculino, provavelmente pelo fato destes agentes tóxicos serem mais frequentemente consumidos em excesso pelos homens (130). Dos 18 pacientes mutantes apenas uma era do gênero feminino (17:1). Na literatura é descrito a relação de pelo menos 4:1 entre pacientes do gênero masculino: feminino, com taxas que variam nas diferentes populações (146). A preferência pela manifestação da neuropatia em indivíduos do gênero masculino com mutação da LHON sugere a existência de um gene de suscetibilidade recessivo ligado ao cromossomo X, agindo em sinergia com a mutação mitocondrial para a expressão do fenótipo. Três estudos recentes de linhagens de LHON encontraram dois loci com alta probabilidade de apresentar este gene de suscetibilidade no cromossomo X: Xp21-Xq21 e Xq25-27.2 (67,96,97).

Ao comparar as médias da idade de início da perda visual entre os 63 pacientes com neuropatia óptica dos grupos I-a x I-b e II-a x II-b, houve diferença estatisticamente significativa nas duas comparações, sendo que a média de idade de início da manifestação da doença em pacientes do grupo I-a é menor do que a do grupo I-b, bem como do grupo II-a é menor do que a do grupo II-b. Este dado mostra que os pacientes com neuropatia óptica que faziam uso abusivo do tabaco e álcool manifestaram a perda visual mais tardiamente. Isto está de acordo com a revisão de 2011 de Andrzej e Graham, sugerindo que estes agentes tóxicos parecem não precipitar a neuropatia óptica (133). O trabalho também mostra que a idade de início da manifestação da perda visual foi acima dos 30 anos apenas nos três indivíduos mutantes do grupo II-b, o que seria naturalmente esperado, pois a

maioria dos pacientes com Leber manifestam sua perda visual entre a segunda e terceira décadas de vida (63, 64,105).

A presença da recorrência familiar materna nos 63 pacientes com neuropatia óptica estava presente em dez dos 17 pacientes do grupo I-a, quatro dos 8 pacientes do grupo I-b, três dos 7 pacientes do grupo II-a e somente seis dos 31 pacientes do grupo II-b. Observa-se que os 25 pacientes com diagnóstico clínico de LHON, grupo I (a+b), compreendem (60.9%) dos casos positivos para recorrência familiar materna, onde é encontrado o maior número de indivíduos mutantes, corroborando com a descrição clínica clássica desta doença. Este dado é semelhante ao da literatura o qual descreve que geralmente os pacientes com LHON apresentam familiares maternos também afetados, porém em 40% dos casos não há história familiar de perda visual. Este fato provavelmente se refere a casos nos quais é difícil traçar o heredograma, pois, casos de mutações *de novo* em LHON são raras (65). A análise dos 18 pacientes mutantes evidencia a recorrência familiar materna em 77,8% dos casos, o que torna esta variável um reforço diagnóstico na prática diária. É importante observar que os três pacientes mutantes do grupo II-b apresentavam história de recorrência familiar, reforçando a importância deste dado, mesmo quando o quadro clínico não preenche todos os critérios classicamente estabelecidos para o diagnóstico de LHON, como consta em publicação anterior (109).

Os resultados dos exames de campo visual tanto do OD quanto do OE mostram associação entre os grupos I-a e I-b, ou seja, pacientes que pertencem a estes grupos apresentam os mesmos resultados para os exames realizados. O mesmo não acontece quando comparados com os outros grupos. Isto pode ser atribuído ao fato de os pacientes do grupo I-a e I-b serem na sua maioria, portadores da mesma morbidade (LHON), enquanto os demais pacientes podem ser portadores de neuropatias ópticas de diferentes etiologias. Nos 18 pacientes mutantes, a impossibilidade de realização do campo visual por 6 pacientes parece decorrer da grave perda visual, pois todos tinham acuidade visual menor que 20/400 em ambos os olhos. Os resultados dos exames de campo visual realizados por 12 pacientes mutantes mostraram escotoma central em 10 olhos e escotoma cecocentral em 14 olhos, defeitos campimétricos estes característicos da doença (147).

Neste estudo, dos 63 pacientes não relacionados com neuropatia óptica, 18 apresentaram mutação para LHON no mtDNA. Considerando-se o total de mutações

independente do tipo, o grupo I-a (pacientes com diagnóstico clínico de LHON sem antecedente de consumo excessivo do tabaco e/ou álcool) foi o que apresentou o maior número de mutantes, compreendendo 55,5% da amostra, seguido do grupo I-b (22.2%), II-b (16.67%) e II-a (5.5%). Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado grupo I (a+b) com o grupo II (a+b), sugerindo que o quadro clínico típico de LHON como descrito por Leber há mais de um século, tem um bom índice de confiabilidade, confirmada em nossos dias, pelo teste molecular (148). A discussão dos resultados moleculares encontrados nos 18 pacientes mutantes já foi realizada anteriormente, no tópico discussão dos resultados moleculares.

A comparação intragrupo, isto é, I-a x I-b e II-a x II-b, permite avaliar se há relação entre os agentes tóxicos analisados, tabaco e álcool, e a suscetibilidade genética de base da LHON, ou seja, a mutação. Quando se verifica a ação das drogas tóxicas analisadas, ao comparar os grupos de pacientes com neuropatia óptica correlacionados I-a com I-b (LHON típico) e II-a com II-b (neuropatia óptica a esclarecer), não houve diferença estatisticamente significativa. O tabaco e o álcool não alteraram a frequência de neuropatia óptica nem no grupo com quadro clínico típico de LHON, nem no grupo de neuropatia óptica a esclarecer. Os 31 pacientes do grupo II-b, são pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer que faziam consumo abusivo do tabaco e do álcool, ou seja, podem ser classificados como portadores de neuropatia óptica tabaco álcool (NOTA). Neste grupo apenas 3 pacientes apresentaram mutação da LHON, portanto não foi possível relacionar a perda visual com uma suscetibilidade genética de base, isto é, a mutação para LHON, com resultado similar a outras publicações anteriores que também não conseguiram fazer esta associação (109,130). O diagnóstico da neuropatia óptica tabaco álcool é de exclusão e permanece como um dilema diagnóstico (103,104,109, 110, 149). No entanto, estudo multicêntrico recente conseguiu estabelecer relação entre o consumo abusivo do tabaco e o maior risco de perda visual em portadores da mutação para LHON. Este efeito foi dose dependente, ou seja, o risco de perda visual foi maior nos indivíduos que fazem consumo abusivo do tabaco do que nos indivíduos que o fazem de forma comedida. Em relação ao consumo abusivo do álcool, o estudo sugeriu correlação com a perda visual, porém os resultados não foram estatisticamente significativos. Estes resultados sugerem

aconselhar os portadores da mutação para LHON a não fumarem e a ingerirem álcool de forma moderada, ou seja, evitar a exposição a estes fatores tóxicos ambientais (105).

O presente trabalho não encontrou diferença estatisticamente significativa quanto à bilateralidade do acometimento visual, isto é, se a perda visual foi simultânea ou sequencial ao comparar os pacientes dos 4 grupos. Todavia, analisando apenas os 18 pacientes mutantes, este estudo mostra perda simultânea em 61,1% dos casos e sequencial em 38,9%, diferente da literatura, onde 75% dos casos de LHON mostram perda bilateral da acuidade visual de forma sequencial entre os olhos e 25% simultaneamente (70,71). Achado pontual interessante é o fato de que a única representante feminina da amostra de mutantes, pertence ao grupo II-a e apresentou um acometimento sequencial de perda visual, com diferença de 3 anos entre um olho e outro, o que é raro de acordo com os relatos da literatura. A perda visual sequencial, geralmente ocorre com a diferença de 6 a 8 semanas entre os olhos. Invariavelmente, dentro do intervalo de um ano, os dois olhos são acometidos (21).

Quanto a acuidade visual, não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar os 4 grupos estudados em relação a esta variável. Porém, pode-se dizer que todos os mutantes se enquadram no diagnóstico de cegueira, quer pela perda visual grave quer pela restrição acentuada do campo visual em ambos os olhos (150,151). Este diagnóstico é baseado nas definições de comprometimento visual da Classificação Internacional das Doenças (CID) (152). Cegueira é definida como a melhor acuidade visual corrigida menor que 20/400 e campo visual central não maior que 10 graus no melhor olho, enquanto que visão subnormal tem como definição melhor acuidade visual corrigida menor que 20/60 a 20/400 (153). Pode-se supor que um acometimento tão intenso da função visual possa servir para auxiliar no diagnóstico clínico da LHON. A neuropatia óptica de Leber tem severo impacto na qualidade de vida dos afetados, e tem a pior classificação no questionário de qualidade de vida VF-14, quando comparado com outras desordens oftalmológicas estudadas (154).

O aspecto do nervo óptico foi outra variável que não apresentou diferença estatisticamente significativa ao comparar os 63 pacientes dos 4 grupos do estudo e portanto, não evidenciou correlação entre o achado de fundo de olho e o prognóstico visual. Os achados dos exames fundoscópicos dos pacientes mutantes variou entre palidez

temporal de papila e atrofia óptica, portanto, todos os pacientes foram avaliados na fase crônica, tardia da doença, quando pode ser difícil fazer o diagnóstico diferencial com outras neuropatias, como compressiva, infiltrativa e inflamatória, principalmente se não há história clara de herança materna. Nestes casos, enquanto não se obtém o resultado do teste genético molecular, um exame de neuroimagem se faz necessário (21).

Ao comparar todas as variáveis anteriormente discutidas entre os mutantes do grupo I, com quadro clínico clássico de LHON e mutantes do grupo II, que a priori tinham o diagnóstico de neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis estudadas. Os mutantes dos grupos I e II mostram comportamento semelhante quanto às variáveis clínicas do estudo, conforme dados na tabela 21. Este resultado, juntamente com os dados da tabela 17, falam a favor de que a despeito do quadro clínico clássico descrito por Leber há mais de um século, ter um bom índice de confiabilidade, o diagnóstico da LHON é molecular (4,42), confirmando a presença da mutação por meio de uma das várias técnicas de rastreamento da mutação, algumas das quais foram usadas neste estudo.

Os resultados obtidos pelo PCR-Multiplex e pela Plataforma Sequenom para rastrear as mutações primárias e secundárias foram compatíveis com os encontrados por outras técnicas mais frequentemente utilizadas, como restrição enzimática e o sequenciamento direto. A Plataforma Sequenom é uma técnica automatizada, mais indicada para a análise de um grande número de amostras, que pode ser realizada em um período de tempo relativamente menor que as demais técnicas utilizadas (138,139). Por sua vez, a técnica de PCR-Multiplex permite a análise das 3 mutações primárias de forma simultânea com baixo custo (134). Sendo assim, esta técnica seria a indicada para análise molecular inicial.

Outra sugestão deste trabalho é a realização de um estudo multicêntrico no Brasil, de pacientes com LHON e suas respectivas famílias, uma vez que o país tem dimensões continentais, foi colonizado por indivíduos de vários continentes e possui grande processo migratório interno até os dias de hoje.



# CONCLUSÃO

---



## 6 - CONCLUSÃO

- 1- A análise comparativa clínica e molecular dos 63 pacientes com neuropatia óptica mostrou diferenças estatisticamente significativa entre os grupos estudados, com quadro clínico típico de LHON (I) e neuropatia óptica de etiologia a esclarecer (II), quanto às variáveis: recorrência familiar materna, exame de campo visual e presença de mutação, sugerindo alta confiabilidade do quadro clínico clássico para diagnóstico da LHON. A comparação entre os 18 pacientes mutantes destes dois grupos (I e II) não mostrou diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis analisadas, sugerindo que o diagnóstico de LHON é molecular, pelo rastreamento das mutações, inicialmente as primárias.
- 2- As mutações encontradas foram G11778A e T14484C, com frequências maiores que as descritas na literatura, para a população mundial. A mutação G11778A foi a mais frequente, confirmando ser a principal causa de LHON também neste grupo de indivíduos brasileiros.
- 3- A mutação G3460A não se apresentou conforme encontrado na literatura, pois não foi observada em nenhum dos pacientes com neuropatia óptica.
- 4- As oito mutações secundárias pesquisadas não foram encontradas nos pacientes deste estudo. Outras regiões do DNA mitocondrial devem ser rastreadas para a pesquisa de diferentes mutações secundárias nestes indivíduos.
- 5- Os haplogrupos dos pacientes mutantes falam a favor da presença de ancestrais comuns de origem asiática, europeia e africana, com predomínio deste último. Não foi possível correlacionar os haplogrupos identificados neste estudo ao maior ou menor risco de expressão do fenótipo nos indivíduos com mutação para LHON.
- 6- Não foi possível estabelecer relação entre os agentes tóxicos tabaco e álcool e uma suscetibilidade genética de base, isto é, a mutação da LHON entre os pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer e com consumo abusivo destes agentes.



# **BIBLIOGRAFIA**

---



## 7 - BIBLIOGRAFIA

1. Scharfe C, Lu HH, Neuenburg JK, Allen EA, Li GC, Klopstock T et al. “Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes”. *PLoS Comput Biol.* 2009 Apr;5(4):e1000374.
2. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005; 39:359–407.
3. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol.* 2008;63:35–9.
4. Yu-Wai-Man PY, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet.* 2009;46:145–58.
5. Farah,SB. Decifrando o genoma humano. In: *Genoma mitocondrial. DNA Segredos e Mistérios.* 2ª edição – São Paulo: Sarvier,2007.
6. Frey TG, Manuella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences.* 2000;25:319-24.
7. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *Journal of Structural Biology.* 1997;119:260–72.
8. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences.* 2000;25:502–8.
9. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 1999;283(5407):1482-8.

10. Carvalho MFPR, Fernando AQ. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2002;68(2).
11. Nardin RA, Johns DR. Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve.* 2001 Feb;24(2):170-91.
12. Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica ilustrada*, 2ª ed. Porto Alegre, Editora Artes Médicas,1997.
13. Junqueira LC, Carneiro J. (eds).*Histologia Básica*, 9ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
14. Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. *Medicine (Baltimore).* 1998;77(1):59-72.
15. Treem WR, Sokol RJ. Disorders of the mitochondria. *Semin Liver Dis.* 1998 18(3):237-53.
16. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biologia Molecular da Célula*. 2ª ed. Porto Alegre, Editora. Artes Médicas, 1997.
17. Sinclair JH e Stevens BJ. Circular DNA filaments from mouse mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1966, August;56(2):508-14.
18. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981;290:457-65.

19. Koehler CM, Merchant S, Oppliger W, Schmid K, Jarosch E, et al. Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *Embo J.* 1998;17:6477–86.
20. Bauer MF, Hofmann S, Neupert W, Brunner M. Protein translocation into mitochondria the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* 2000;10:25–31.
21. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies—disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30:81–114.
22. Taylor RW e Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics.* 2005;6:389–402.
23. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics.* 1997;13:450–5.
24. Chinnery PF. Modulating heteroplasmy. *Trends in Genetics.* 2002;18:173–6.
25. Shoubridge EA, Karpati G, Hastings KEM. Deletion mutants are functionally dominant over wild-type mitochondrial genomes in skeletal-muscle fiber segments in mitochondrial disease. *Cell.* 1990;62:43–9.
26. Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *American Journal of Human Genetics.* 2006;79:469–80.
27. Durham SE, Samuels DC, Cree LM, Chinnery PF. Normal levels of wild-type mitochondrial DNA maintain cytochrome c oxidase activity for two pathogenic

- mitochondrial DNA mutations but not for m.3243A>G. *American Journal of Human Genetics*. 2007;81:189–95.
28. Tono T, Ushisako Y, Kiyomizu K, Usami S, Abe S, Shinkawa H et al. Cochlear implantation in a patient with profound hearing loss with the A1555G mitochondrial mutation. *Am J Otol*. 1998;19:754-7.
  29. Howell N, Chinnery PF, Ghosh SS, Fahy E, Turnbull DM. Transmission of the human mitochondrial genome. *Humam Reproduction*.2000;15(2): 235-45.
  30. De Robertis (Jr.), H. P. *Biologia Celular e Molecular*. Guanabara-Koogan: RJ (2003).
  31. Sadagopan KA, Capasso J, Levin AV. Genetics for the ophthalmologist. *Oman J Ophthalmol*. 2012 Sep-Dec; 5(3): 144–9.
  32. Howell N, Kubacka I, Mackey DA. How rapidly does the human mitochondrial genome evolve phenotypes? *American Journal of Human Genetics*. 1996;59:501–9.
  33. Jazin E, Soodyall H, Jalonen P, Lindholm E, Stoneking M, Gyllensten U. Mitochondrial mutation rate revisited: hot spots and polymorphism. *Nature Genetics*. 1998;18:109–10.
  34. Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston Greiner R, Wilson MR. A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics*. 1997;15:363–8.
  35. Siguroardottir S, Helgason A, Gulcher JR, Stefansson K, Donnelly P. The mutation rate in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*. 2000;66:1599–1609.

36. Cann RL. Genetic clues to dispersal in human populations: retracing the past from the present. *Science*. 2001;291:1742–48.
37. Mitomap. A Human Mitochondrial Genome Database. Available: [Http://www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) Accessed 2012 Mar 2. Derbeneva 2009
38. Torroni A, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 1994;26:261–71.
39. Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *American Journal of Human Genetics*. 2002;70:1152–71.
40. Marriage B, Clandinin MT, Glerum DM "Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders". *J Am Diet Assoc*. 2003;103(8): 1029 -38.
41. Dimauro S. Lessons from mitochondrial DNA mutations. *Semin Cell Dev Biol*. 2001;12(6):397-405.
42. Yu-Wai-Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet*. 2002;39:162–9.
43. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988;242(4884):1427-30.
44. Newman NJ. From genotype to phenotype in Leber hereditary optic neuropathy: still more questions than answers. *J Neuroophthalmol*. 2002;22:257–61.

45. Mroczek-Tonska K, Kisiel B, Piechota J, Bartnik E. Leber hereditary optic neuropathy--a disease with a known molecular basis but a mysterious mechanism of pathology. *J Appl Genet.* 2003;44(4):529-38.
46. Newman NJ. Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. *Arch Neurol.* 1993;50(5):540-8.
47. Huoponen K. Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. *Neurogenetics.* 2001;3(3):119-25.
48. Newman NJ, Lott MT, Wallace DC. The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. *Am J Ophthalmol.* 1991;111:750-62.
49. Harding AE, Sweeney MG, Govan GG, Riordan-Eva P. Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *Am J Hum Genet.* 1995;57:77-86.
50. Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1992;187:1551-57.
51. Mackey D, Howell N. A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology. *American Journal of Human Genetics.* 1992;51:1218-28.
52. Macmillan C, Kirkham T, Fu K, Allison V, Andermann E, Chitayat D, Fortier D, Gans M, Hare H, Quercia N, Zackon D, Shoubridge EA. Pedigree analysis of French Canadian families with T14484C Leber's hereditary optic neuropathy. *Neurology.* 1998;50:417-22.

53. Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D. Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *American Journal of Human Genetics*. 1991;49:939–50.
54. Huoponen K, Vilkki J, Aula P, Nikoskelainen EK, Savontaus ML. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *American Journal of Human Genetics*. 1991;48:1147–53.
55. Taylor RW, Jobling MS, Turnbull DM, Chinnery PF. Frequency of rare mitochondrial DNA mutations in patients with suspected Leber's hereditary optic neuropathy. *Journal of Medical Genetics*. 2003;40.
56. Nikoskelainen EK, Savontaus M, Huoponen K, Antila K, Hartiala J. Pre-excitation syndrome in Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet*. 1994;344:857–58.
57. Blakely EL, de Silva R, King A, Schwarzer V, Harrower T, Dawidek G. LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial *MTND1* gene mutation. *European Journal of Human Genetics*. 2005;13:623–27.
58. Spruijt L, Smeets HJ, Hendrickx A, Bettink-Remeijer MW, Maat-Kievit A, Schoonderwoerd KC. A MELAS-associated ND1 mutation causing Leber hereditary optic neuropathy and spastic dystonia. *Archives of Neurology*. 2007;64:890–93.
59. Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *American Journal of Human Genetics*. 2003;72:333–9.
60. Spruijt L, Kolbach DN, de Coo RF, Plomp AS, Bauer NJ, Smeets HJ. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. *American Journal of Ophthalmology*. 2006;141:676–82.

61. Puomila A, Hamalainen P, Kivioja S, Savontaus ML, Koivumaki S, Huoponen K. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *European Journal of Human Genetics*. 2007;15:1079–89.
62. Mackey DA, Buttery RG. Leber hereditary optic neuropathy in Australia. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*. 1992;20:177–84.
63. Yu-Wai-Man P, Bateman DE, Hudson G, Griffiths PG, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy presenting in a 75-year-old man. *Journal of Neuroophthalmology*. 2008;28:155.
64. Dagi LR, Rizzo JF, Cestari DM. Leber hereditary optic neuropathy in an octogenarian. *J Neuroophthalmol*. 2008;28:156.
65. Biousse V, Brown MD, Newman NJ, Allen JC, Rosenfeld J, Meola G, Wallace DC. De novo 14484 mitochondrial DNA mutation in monozygotic twins discordant for Leber's hereditary optic neuropathy. *Neurology*. 1997;49:1136–8.
66. Pegoraro E, Vettori A, Valentino ML, Molon A, Mostacciolo ML, Howell N et al. X-inactivation pattern in multiple tissues from two Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) patients. *Am J Med Genet A* 2003;119A:37-40.
67. Ji Y, Jia X, Li S, Xiao X, Guo X, Zhang Q. Evaluation of the X-linked modifier loci for Leber hereditary optic neuropathy with the G11778A mutation in Chinese. *Mol. Vis*. 2010;16:416–424.
68. Savini G, Barboni P, Valentino ML, Montagna P, Cortelli P, De Negri AM et al. Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy mutations. *Ophthalmology*. 2005;112:127–31.

69. Quiros PA, Torres RJ, Salomao S, Berezovsky A, Carelli V, Sherman J. Colour vision defects in asymptomatic carriers of the Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) mtDNA 11778 mutation from a large Brazilian LHON pedigree: a case-control study. *British Journal of Ophthalmology*. 2006;90:150–3.
70. Nikoskelainen EK, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Nummelin K, Savontaus ML. Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. *Ophthalmology*. 1996;103:504–14.
71. GeneReviews™ Edited by Roberta A Pagon, Editor-in-chief, Thomas D Bird, Cynthia R Dolan, Karen Stephens, and Margaret P Adam. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993- última revisão em abril, 2012.
72. Riordan-Eva P, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med Genet*. 1995;32:81–7.
73. Stone EM, Newman NJ, Miller NR, Johns DR, Lott MT, Wallace DC. Visual recovery in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and the 11778 mutation. *Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology*. 1992;12:10–4.
74. Barboni P, Savini G, Valentino ML, La Morgia C, Bellusci C, De Negri AM. Leber's hereditary optic neuropathy with childhood onset. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47:5303–09.
75. Bower SP, Hawley I, Mackey DA. Cardiac arrhythmia and Leber's hereditary optic neuropathy. *Lancet*. 1992;339:1427–28.
76. Nikoskelainen EK, Marttila RJ, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Sonninen P. Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary

- optic neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 1995;59:160–4.
77. Meire FM, Van Coster R, Cochaux P, Obermaier-Kusser B, Candaele C, Martin JJ. Neurological disorders in members of families with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) caused by different mitochondrial mutations. *Ophthalmic Genetics*. 1995;16:119–26.
78. Minatsakanyan L, Ross-Cisneros FN, Carelli V, Wang MY, Sadun AA. Axonal degeneration in peripheral nerves in a case of Leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol* 2011;31:6-11.
79. Newman NJ. Leber hereditary optic neuropathy: some new observations. *J Neuroophthalmol* 2011;31:31-5.
80. Jun AS, Brown MD, Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:6206–10.
81. De Vries DD, Went LN, Bruyn GW, Scholte HR, Hofstra RM, Bolhuis PA. Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. *American Journal of Human Genetics*. 1996;58:703–11.
82. Harding AE, Sweeney MG, Miller DH, Mumford CJ, Kellar-Wood H, Menard D. Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *Brain*. 1992;115:979–89.
83. McClelland CM, Van Stavern GP, Tselis AC. Leber hereditary optic neuropathy mimicking neuromyelitis optica. *J Neuroophthalmol*. 2011 Sep;31(3):265-8.

84. Van Western D, Hammar B, Bynke G. Magnetic resonance findings in the pregeniculate visual pathways in Leber hereditary optic neuropathy. *J neuroophthalmol.* 2011;31:48-51.
85. Newman NJ. Leber hereditary optic neuropathy: bad habits, bad vision. *Brain.* 2009;132:2306–08.
86. Smith KH, Johns DR, Heher KL, Miller NR. Heteroplasmy in **Leber's** hereditary optic neuropathy. *Arch Ophthalmol.* 1993;111:1486–90.
87. Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, Howell N. Leber hereditary optic neuropathy: does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? *American Journal of Medical Genetics.* 2001;98:235–43.
88. Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *American Journal of Human Genetics.* 2007;81:228–33.
89. Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102:3225–9.
90. Qian Y, Zhou X, Liang M, Qu J, Guan MX. The altered activity of complex III may contribute to the high penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy in a Chinese family carrying the ND4 G11778A mutation. *Mitochondrion.* 2011 Nov;11(6):871-7.

91. Qu J, Wang Y, Tong Y, et al. Leber's hereditary optic neuropathy affects only female matrilineal relatives in two Chinese families. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:4906-12.
92. Ji Y, Zhang A-M, Jia X, Zhang Y-P, Xiao X, Li S et al. Mitochondrial DNA haplogroups M7b1'2 and M8a affect clinical expression of leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m.11778G→A mutation. *Am J Hum Genet.* 2008;83:760–8.
93. Kaewsutthi S, Phasukkijwatana N, Joyjinda Y, Chuenkongkaew W, Kunhapan B, et al. Mitochondrial haplogroup background may influence Southeast Asian G11778A Leber hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:4742–8.
94. Shafa Shariat PM, Houshmand M, Tabassi AR. Mitochondrial D-loop variation in leber hereditary neuropathy patients harboring primary G11778A, G3460A, T14484C mutations: J and W haplogroups as high-risk factors. *Arch Med Res.* 2006;37:1028–1033.
95. Carelli V, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O, Pala M et al. Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Am. J. Hum. Genet.* 2006; 78, 564–74.
96. Hudson G, Keers S, Man PYW, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML. Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *American Journal of Human Genetics.* 2005;77:1086–91.
97. Shankar SP, Fingert JH, Carelli V, Valentino ML, King TM, Daiger SP. Evidence for a novel x-linked modifier locus for leber hereditary optic neuropathy. *Ophthalmic Genetics.* 2008;29:17–24.

98. Tong Y, Sun YH, Zhou X, Zhao F, Mao Y, Wei QP et al. Very low penetrance of Leber's hereditary optic neuropathy in five Han Chinese families carrying the ND1 G3460A mutation. *Mol Genet Metab.* 2010;99:417–24.
99. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:726–734.
100. Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *New England Journal of Medicine.* 2008;359:61–73.
101. Daniel DDC, Jueng SY, Peter A J. DNA Methylation and Cellular Reprogramming. *Trends Cell Biol.* 2010 October; 20(10): 609–17.
102. Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH. Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. *PLoS One.* 2011;6(7):e21662.
103. Tsao K, Aitken PA, Johns DR. Smoking as an aetiological factor in a pedigree with Leber's hereditary optic neuropathy. *British Journal of Ophthalmology.* 1999;83:577–81.
104. Kerrison JB, Miller NR, Hsu FC, Beaty TH, Maumenee IH, Smith KH et al. A case-control study of tobacco and alcohol consumption in Leber hereditary optic neuropathy. *Am J Ophthalmol.* 2000;130:803–12.
105. Kirkman MA, Yu-Wai-Man P, Korsten A, Leonhardt M, Dimitriadis K, De Coo IF. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain.* 2009;132:2317–26.

106. Sanchez RN, Smith AJ, Carelli V, Sadun AA, Keltner JL. Leber hereditary optic neuropathy possibly triggered by exposure to tire fire. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2006;26:268–72.
107. Johns DR, Smith KH, Miller NR, Sulewki ME, Bias WB. Identical twins who are discordant for Leber's hereditary optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1993;111:1497-4.
108. Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, Caparrotta L, Martinuzzi A, Ragazzi E, Ghelli A, Sadun AA, d'Amati G, Carelli V. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011;134:220–34.
109. Amaral-Fernandes MS, Marcondes AM, Miranda PM, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Mutations for Leber hereditary optic neuropathy in patients with alcohol and tobacco optic neuropathy. *Mol Vis*. 2011;17:3175-9.
110. Chalmers RM, Harding AE. A case-control study of Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 1996;119:1481–86.
111. Sadun AA, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Quiros PA, Sadun F. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *American Journal of Ophthalmology*. 2003;136:231–8.
112. Carelli V, Franceschini F, Venturi S, Barboni P, Savini G, Barbieri G. Grand rounds: could occupational exposure to n-hexane and other solvents precipitate visual failure in Leber hereditary optic neuropathy? *Environmental Health Perspectives*. 2007;115:113–5.

- 113.Sadun AA, Martone JF, Mucimendoza R, Reyes L, Dubois L, Silva JC. Epidemic optic neuropathy in Cuba – eye findings. Archives of Ophthalmology. 1994;112:691–9.
- 114.Mackey DA, Fingert JH, Luzhansky JZ, McCluskey PJ, Howell N, Hall AJH. Leber’s hereditary optic neuropathy triggered by antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus. Eye. 2003;17:312–7
- 115.Sadun F, De Negri AM, Carelli V, Salomao SR, Berezovsky A, Andrade R, Moraes Met al. Ophthalmologic findings in a large pedigree of 11778/Haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. Am J Ophthalmol. 2004;137:271–7.
- 116.Barbiroli B, Montagna P, Cortelli P, Iotti S, Lodi R, Barboni P. Defective brain and muscle energy-metabolism shown by in-vivo P-31 magnetic-resonance spectroscopy in nonaffected carriers of 11778-mtDNA mutation. Neurology. 1995;45:1364–69.
- 117.Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. Progress in Retinal and Eye Research. 2004;23:53–89.
- 118.Yen MY, Kao SH, Wang AG, Wei YH. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA in Leber’s hereditary optic neuropathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2004;45:1688–91.
- 119.Beretta S, Mattavelli L, Sala G, Tremolizzo L, Schapira AHV, Martinuzzi A. Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. Brain. 2004;127:2183–92.
- 120.Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies. Neurochem Int. 2002;40:573–84.

121. Barron MJ, Griffiths P, Turnbull DM, Bates D, Nichols P. The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head. *British Journal of Ophthalmology*. 2004;88:286–90.
122. Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroscience*. 2009;29:12776–86.
123. Sadun AA, Win PH, Ross-Cisneros FN, Walker SO, Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy differentially affects smaller axons in the optic nerve. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2000;98:223-32.
124. Ramos CDVF, Bellusci C, Savini G, Carbonelli M, Berezovsky A, Tamaki C. Association of optic disc size with development and prognosis of Leber's hereditary optic neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009;50:1666–74.
125. Hayreh SS. Ischemic optic neuropathy. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2009;28:34–62.
126. Barboni P, Carbonelli M, Savini G, Ramos CD, Carta A, Berezovsky A. Natural history of Leber's hereditary optic neuropathy: longitudinal analysis of the retinal nerve fiber layer by optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2009.
127. Seo JH, Hwang JM, Park SS. Comparison of retinal nerve fibre layers between 11778 and 14484 mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Eye (London)* 2009.

128. Yang Z, Harrison CA, Chuang GC, Ballinger SW. The role of tobacco smoke induced mitochondrial damage in vascular dysfunction and atherosclerosis. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007;621:61–74.
129. Sharma p, Sharma R. Toxic optic neuropathy. *Indian J Ophthalmol*. 2011;59(2):137-41.
130. Cullom ME, Heher KL, Miller NR, Savino PJ, Johns DR. Leber's hereditary optic neuropathy masquerading as tobacco-alcohol amblyopia. *Arch Ophthalmol* 1993;111:1482-5.
131. Frisen L. Fundus changes in acute malnutritional optic neuropathy. *Arch Ophthalmol*. 1983;101:577-9.
132. Kerrison JB. Optic neuropathies caused by toxins and adverse drug reactions. *Ophthalmol Clin North Am*. 2004;17:481-8.
133. Grzybowski A, Holder GE. Tobacco optic neuropathy (TON)- the historical and present concept of the disease. *Acta Ophthalmol* 2011;89:495-9.
134. Bi R, Zhang A-M, Yu D, Chen D, Yao Y-G. Screening the three LHON primary mutations in the general Chinese population by using an optimized multiplex allele-specific PCR. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1671–4.
135. Griffin TJ, Smith LM. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. In: Housby, J.N. (ed) *Mass Spectrometry and Genomic Analysis*. Kluwer Academic Publishers. 149 p., 2001.

136. Gut IG. SNP genotyping by MALDI mass spectrometry. In: Gut, I.G., Lathrop, M., Weeks, D. (eds) *Methods for the elucidation of genomic variation. Ateliers de formation-INSERM. La Roche Posay 2-3, 2002.*
137. Walters JJ; Muhammad W; Fox KF; Fox A; Xie D; Creek KE et al. Genotyping single nucleotide polymorphisms using intact polymerase chain reaction products by electrospray quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1752–1759, 2001.
138. Gabriel S, Ziaugra L, Tabbaa D. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr. Protocols Human Genet.* 2009. Chapter 2:Unit 2.12.
139. Jurinke C, Oeth P, Van den Boom D. MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis. *Mol Biotechnol.* 2004 Feb;26(2):147-64.
140. Yen MY, Wang AG, Chang WL, Hsu WM, Liu JH, Wei YH. Leber's hereditary optic neuropathy-the spectrum of mitochondrial DNA mutations in Chinese patients. *Jpn J Ophthalmol.* 2002;46:45–51.
141. Shu L, Zhang YM, Huang XX, Chen CY, Zhang XN. Complete mitochondrial DNA sequence analysis in two southern Chinese pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy revealed secondary mutations along with the primary mutation. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(1):28-31.
142. Chuenkongkaew WL, Suphavitai R, Vaeusorn L, Phasukkijwatana N, Lertrit P, Suktitipat B. Proportion of 11778 mutant mitochondrial DNA and clinical expression in a Thai population with Leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol.* 2005 Sep;25(3):173-5.

143. Sudoyo H, Suryadi H, Lertrit P, Pramoonjago P, Lyrawati D, Marzuki S. Asian-specific mtDNA backgrounds associated with the primary G11778A mutation of Leber's hereditary optic neuropathy. *J Hum Genet.* 2002;47(11):594-604.
144. Kumar M, Tanwar M, Saxena R, Sharma P, Dada R. Identification of novel mitochondrial mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Mol Vis.* 2010;16:782–792.
145. Achilli A, Iommarini L, Olivieri A, Pala M, Hooshiar Kashani B, Reynier P et al. Rare primary mitochondrial DNA mutations and probable synergistic variants in Leber's hereditary optic neuropathy. *PLoS One.* 2012;7(8):e42242.
146. Abu-Amero KK. Leber's Hereditary Optic Neuropathy: The Mitochondrial Connection Revisited. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2011;18(1):17-23.
147. Hwang JM, Kim J, Park SS. Leber's hereditary optic neuropathy mutations in ethambutol-induced optic neuropathy. *J Neurol.* 2003 Jan;250(1):87-9.
148. Kirches E. LHON: Mitochondrial Mutations and More. *Current Genomics.* 2011;12:44-54.
149. Syed S, Lioutas V. Tobacco-alcohol amblyopia: a diagnostic dilemma. *J Neurol Sci.* 2013 Apr 15;327(1-2):41-5.
150. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol.* 2012 May;96(5):614-8.
151. Resnikoff S, Keys TU. Future trends in global blindness. *Indian J Ophthalmol.* 2012 Sep-Oct;60(5):387-95. doi: 10.4103/0301-4738.100532. Review.

152. World Health Organization International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th revision Current version Version for 2003 Chapter VII H54 Blindness and low vision. <http://www.who.int/classifications/icd/en/>
153. Dandona L, Dandona R. What is the global burden of visual impairment? *BMC Med.* 2006;4:6.
154. Kirkman MA, Korsten A, Leonhardt M, Dimitriadis K, De Coo I, Klopstock T et al. Quality of Life in patients with Leber Hereditary Optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jul;50(7):3112-5.

# APÊNDICES

---



## 8- APÊNDICES

### APÊNDICE 1 – Pacientes com diagnóstico clínico de LHON (Grupo I-a)

Tabela 24- Grupo I-a - Pacientes com diagnóstico clínico de LHON, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n =17).

Iniciais	Gênero	Idade	Bilateral	Recorrência familiar materna	Acuidade visual	Nervo óptico	Campo visual Od/Oe	Mutação
JASN	M	11	simultâneo	+	Od20/100 Oe 20/200	palidez temporal	central central	T14484C
GAQC	M	14	sequencial, 1semana	+	Od<20/400 Oe 20/100	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A
DC	M	15	simultâneo	-	Od20/100 Oe 20/100	palidez temporal	central central	-
PSQS	M	20	sequencial, 2 semanas	-	Od<20/400 Oe 20/200	palidez temporal	impraticável impraticável	-
PFS	M	13	simultâneo	-	Od 20/100 Oe 20/200	palidez temporal	central cecocentral	-
PCM	M	15	simultâneo	+	Od 20/200 Oe 20/100	palidez temporal	cecocentral central	-
SFV	M	16	sequencial, 5 meses	+	Od 20/200 Oe 20/200	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
FBG	M	28	simultâneo	-	Od 20/50 Oe 20/50	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
AAL	M	29	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	impraticável impraticável	G11778A
PSR	M	15	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A
LSA	M	15	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	central cecocentral	G11778A
NDO	M	19	sequencial, 2 meses	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	cecocentral cecocentral	G11778A
RAO	M	19	sequencial, 1mês	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	T14484C
LD	M	16	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	impraticável impraticável	T14484C
EDV	M	25	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	cecocentral cecocentral	G11778A
RCS	M	19	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	central cecocentral	G11778A
EA	M	12	sequencial, 1mês	+	Od 20/100 Oe 20/200	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-

M- Masculino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

**APÊNDICE 2 - Pacientes com diagnóstico clínico de LHON (Grupo I-b)**

**Tabela 25 - Grupo I-b - Pacientes com diagnóstico clínico de LHON, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n=8).**

<b>Iniciais</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Bilateral</b>	<b>Recorrência familiar Materna</b>	<b>Acuidade Visual</b>	<b>Nervo óptico</b>	<b>Campo visual Od/Oe</b>	<b>Mutação</b>
AAM	M	21	simultâneo	-	Od20/100 Oe 20/100	palidez temporal	central central	-
EWN	M	27	sequencial, 2 meses	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	central central	G11778A
USS	M	27	sequencial, 1 semana	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	central central	G11778A
SAP	M	29	simultâneo	-	Od20/50 Oe 20/50	palidez temporal	central central	-
LRB	M	17	sequencial, 1 semana	-	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A
VMP	M	25	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
ADMB	M	28	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	central cecocentral	-
RCV	M	17	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	central central	G11778A

M- Masculino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

**APÊNDICE 3 - Pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer (Grupo II-a)**

**Tabela 26 - Grupo II-a - Pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n=7).**

<b>Iniciais</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Bilateral</b>	<b>Recorrência familiar Materna</b>	<b>Acuidade Visual</b>	<b>Nervo óptico</b>	<b>Campo visual Od/Oe</b>	<b>Mutação</b>
ZSC	F	28	sequencial, 3 anos	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A
MSY	F	40	sequencial, 6 meses	-	Od 20/100 Oe 20/100	atrofia óptica	central central	-
MLSC	F	17	simultâneo	-	Od 20/50 Oe 20/100	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
MAS	F	21	simultâneo	-	Od20/60 Oe 20/50	palidez temporal	central cecocentral	-
IAF	F	30	simultâneo	+	Od20/80 Oe 20/80	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	-
AMA	F	15	simultâneo	+	Od20/200 Oe 20/200	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
ILF	F	60	simultâneo	-	Od20/60 Oe 20/60	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-

F- Feminino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

**APÊNDICE 4 – Pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer (Grupo II-b)**

**Tabela 27 - Grupo II-b - Pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool (n=31).**

Iniciais	Gênero	Idade	Bilateral	Recorrência familiar materna	Acuidade visual	Nervo óptico	Campo visual Od/Oe	Mutação
AAGS	M	43	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A
SRR	M	36	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	-
MLF	F	39	simultâneo	-	Od 20/60 Oe 20/100	atrofia óptica	central central	-
EAS	M	35	simultâneo	-	Od 20/200 Oe 20/200	palidez temporal	cecocentral central	-
ULA	M	35	simultâneo	+	Od20/100 Oe 20/50	palidez temporal	central central	-
BEO	M	35	sequencial, 1 ano	-	Od20/200 Oe<20/400	palidez temporal	central central	-
VLS	M	47	simultâneo	+	Od20/200 Oe 20/200	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	T14484C
CAL	M	46	simultâneo	-	Od20/50 Oe 20/60	normal normal	central central	-
PGS	M	42	simultâneo	-	Od 20/200 Os 20/200	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
RF	M	52	simultâneo	-	Od 20/200 Oe 20/100	normal normal	central central	-
RSO	M	35	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A
VNS	M	46	simultâneo	-	Od20/100 Oe 20/100	normal normal	central central	-
HD	M	38	simultâneo	-	Od 20/60 Oe 20/60	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
JG	M	43	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	central central	-
AG	M	44	simultâneo	-	Od 20/50 Oe 20/50	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
JCM	M	41	simultâneo	-	Od 20/200 Oe 20/200	palidez temporal	central central	-
LJ	M	52	simultâneo	-	Od 20/200 Oe 20/200	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
OOS	M	40	sequencial, 6 meses	-	Od 20/50 Oe 20/50	palidez temporal	central central	-
AR	M	50	simultâneo	-	Od<20/400 Oe 20/200	atrofia óptica	central impraticável	-
VP	M	44	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	central central	-
NB	M	41	sequencial, 1 mês	-	Od 20/200 Oe 20/50	palidez temporal	cecocentral central	-

JAR	M	40	simultâneo	-	Od 20/50 Oe 20/50	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
JCS	M	33	simultâneo	-	Od 20/100 Oe 20/100	palidez temporal	central central	-
RMM	M	38	simultâneo	-	Od 20/60 Oe 20/60	palidez temporal	central central	-
OG	F	20	simultâneo	-	Od 20/50 Oe 20/100	palidez temporal	central cecocentral	-
ASDS	M	48	simultâneo	-	Od 20/50 Oe 20/100	palidez temporal	cecocentral cecocentral	-
CAG	M	36	simultâneo	-	Od <20/400 Oe <20/400	atrofia óptica	central impraticável	-
LM	M	33	simultâneo	-	Od 20/60 Oe 20/60	palidez temporal	central cecocentral	-
PLS	M	49	simultâneo	+	Od 20/200 Oe <20/400	palidez temporal	central cecocentral	-
JBM	M	35	simultâneo	-	Od <20/400 Oe <20/400	palidez temporal	central central	-
HM	M	54	simultâneo	-	Od 20/50 Oe 20/100	palidez temporal	cecocentral central	-

**M-** Masculino; **F-** Feminino; **Od-** Olho Direito; **Oe-** Olho Esquerdo

**APÊNDICE 5 – Pacientes mutantes com diagnóstico clínico de LHON (Grupo I-a)**

**Tabela 28 - Grupo I-a - Pacientes mutantes com diagnóstico clínico de LHON, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.**

Iniciais	Gênero	Idade	Bilateral	Recorrência familiar Materna	Acuidade visual	Nervo óptico	Campo visual Od/Oe	Mutação	Haplogrupos
JASN	M	11	simultâneo	+	Od20/100 Oe 20/200	palidez temporal	central central	T14484C	L1/L2
GAQC	M	14	sequencial, 1 semana	+	Od<20/400 Oe 20/100	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A	L1/L2
AAL	M	29	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	impraticável impraticável	G11778A	L3
PSR	M	15	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A	L1/L2
LSA	M	15	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	central cecocentral	G11778A	L3, C e M
NDO	M	19	sequencial, 2 meses	-	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	cecocentral cecocentral	G11778A	L3 e U
RAO	M	19	sequencial, 1 mes	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	T14484C	L3 e U
LD	M	16	simultâneo	-	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	impraticável impraticável	T14484C	L3
EDV	M	25	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	cecocentral cecocentral	G11778A	L1/L2
RCS	M	19	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	central cecocentral	G11778A	L1/L2

M- Masculino; F- Feminino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

**APÊNDICE 6 – Pacientes mutantes com diagnóstico clínico de LHON (Grupo I-b)**

**Tabela 29 - Grupo I-b - Pacientes mutantes com diagnóstico clínico de LHON, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.**

Iniciais	Gênero	Idade	Bilateral	Recorrência familiar Materna	Acuidade Visual	Nervo óptico	Campo visual Od/Oe	Mutação	Haplogrupos
EWN	M	27	sequencial, 2 meses	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	central central	G11778A	L1/L2
USS	M	27	sequencial, 1 semana	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	central central	G11778A	L3, C, M
LRB	M	17	sequencial, 1 semana	-	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A	L1/L2
RCV	M	17	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	central central	G11778A	L3, D, M

M- Masculino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

**APÊNDICE 7 – Pacientes mutantes com neuropatia óptica a esclarecer (Grupo II-a)**

**Tabela 30 - Grupo II-a Pacientes mutantes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, sem antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.**

Iniciais	Gênero	Idade	Bilateral	Recorrência familiar materna	Acuidade visual	Nervo óptico	Campo visual Od/Oe	Mutação	Haplogrupos
ZSC	F	28	sequencial, 3 anos	+	Od<20/400 Oe<20/400	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	G11778A	L3

F- Feminino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

**APÊNDICE 8 - Pacientes mutantes com neuropatia óptica a esclarecer (Grupo II-b)**

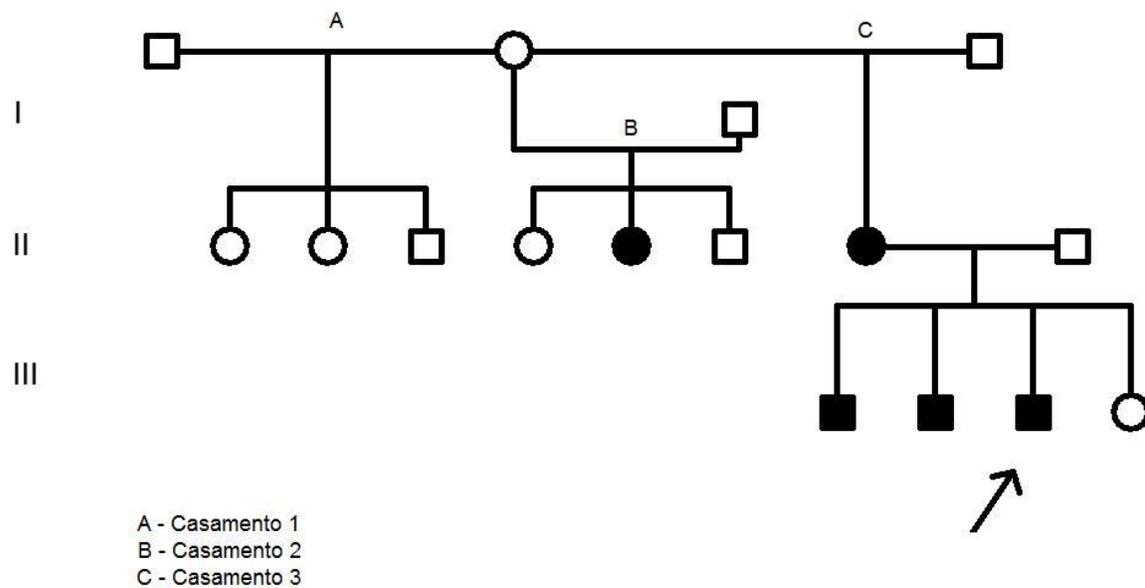
**Tabela 31 - Grupo II-b Pacientes mutantes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, com antecedente de consumo abusivo de tabaco e/ou álcool.**

Iniciais	Gênero	Idade	Bilateral	Recorrência familiar materna	Acuidade Visual	Nervo óptico	Campo visual Od/Oe	Mutação	Haplogrupos
AAGS	M	43	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A	L3
VLS	M	47	simultâneo	+	Od 20/200 Oe 20/200	atrofia óptica	cecocentral cecocentral	T14484C	L3
RSO	M	35	simultâneo	+	Od<20/400 Oe<20/400	palidez temporal	impraticável impraticável	G11778A	L3, C e M

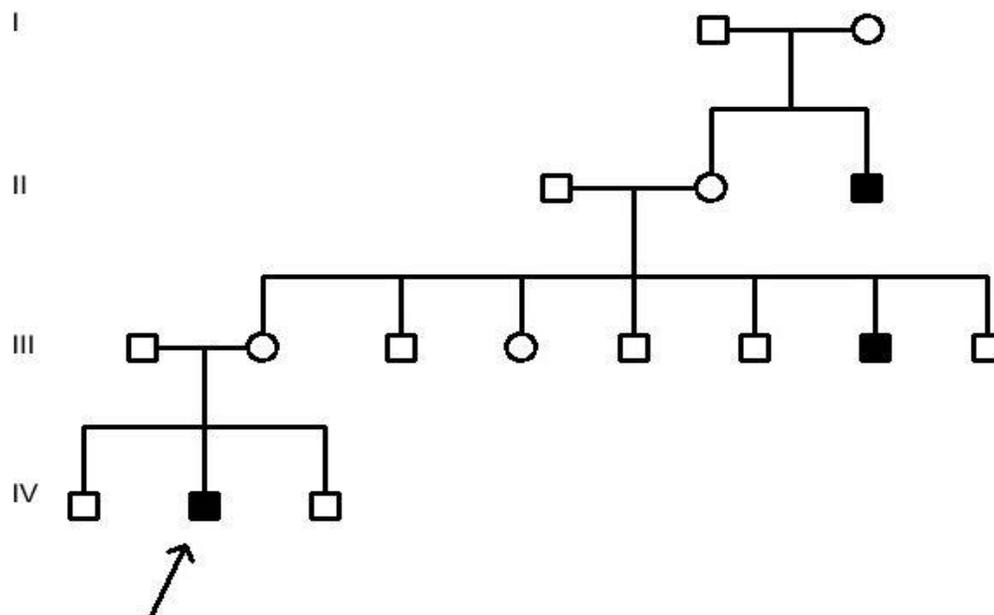
M- Masculino; Od- Olho Direito; Oe- Olho Esquerdo

**APÊNDICE 9 – Heredogramas dos pacientes mutantes para LHON que possuem recorrência familiar materna**

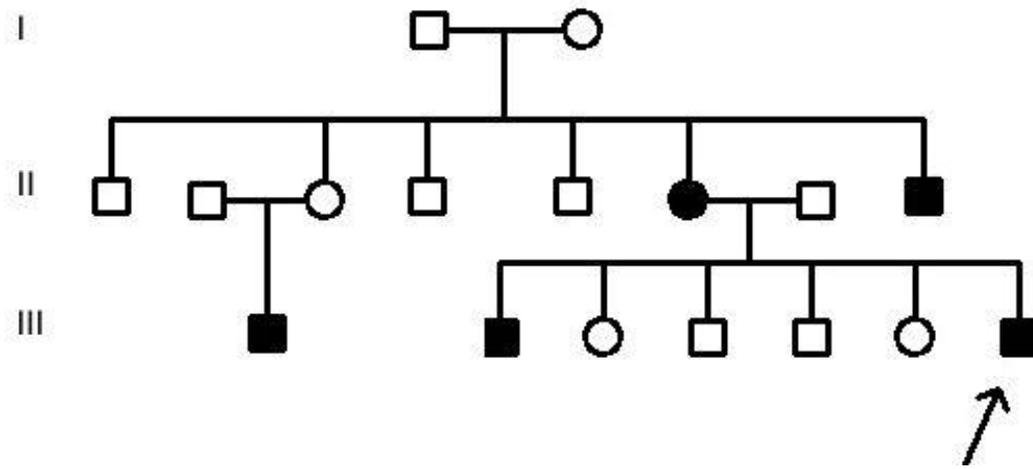
**1 - JASN**



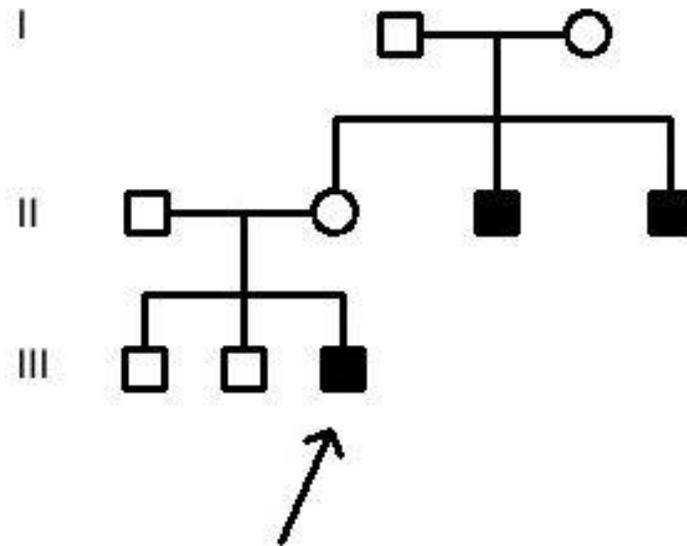
**2 - GAQC**



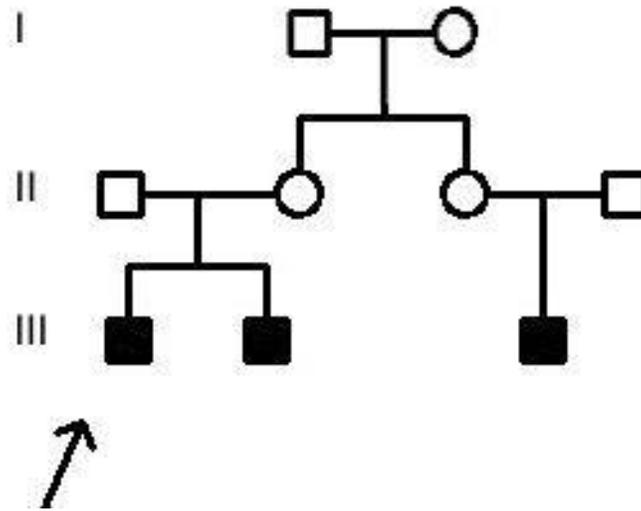
3 - AAL



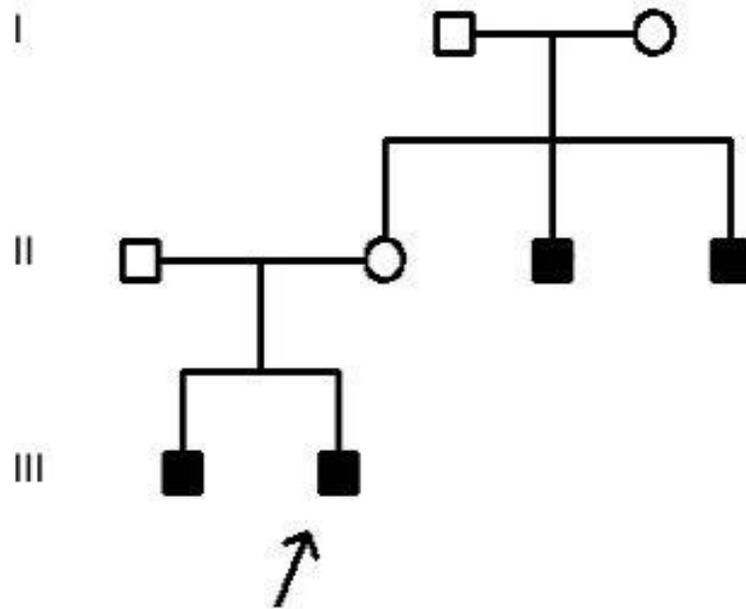
4 - LSA



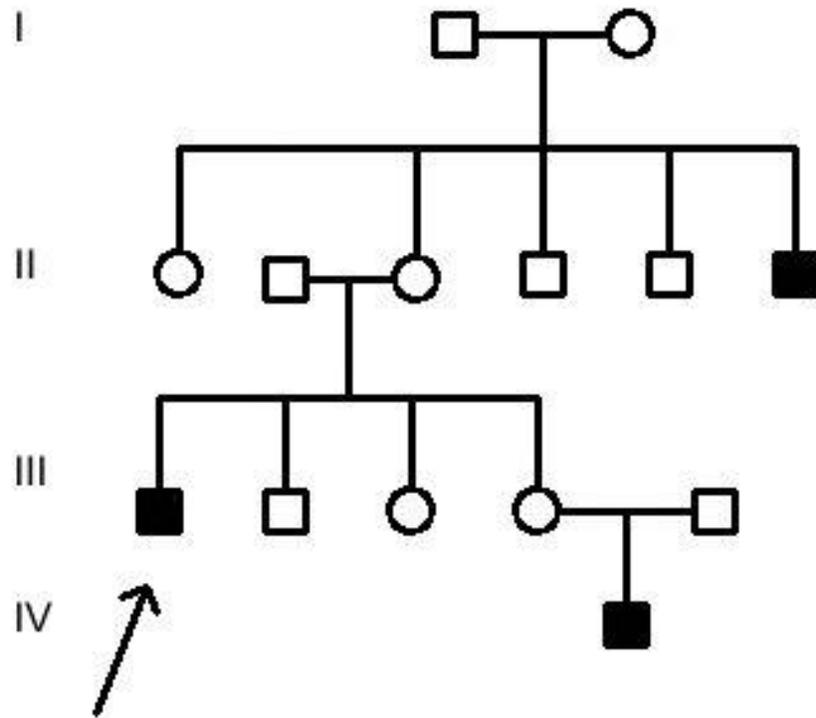
5 - RAO



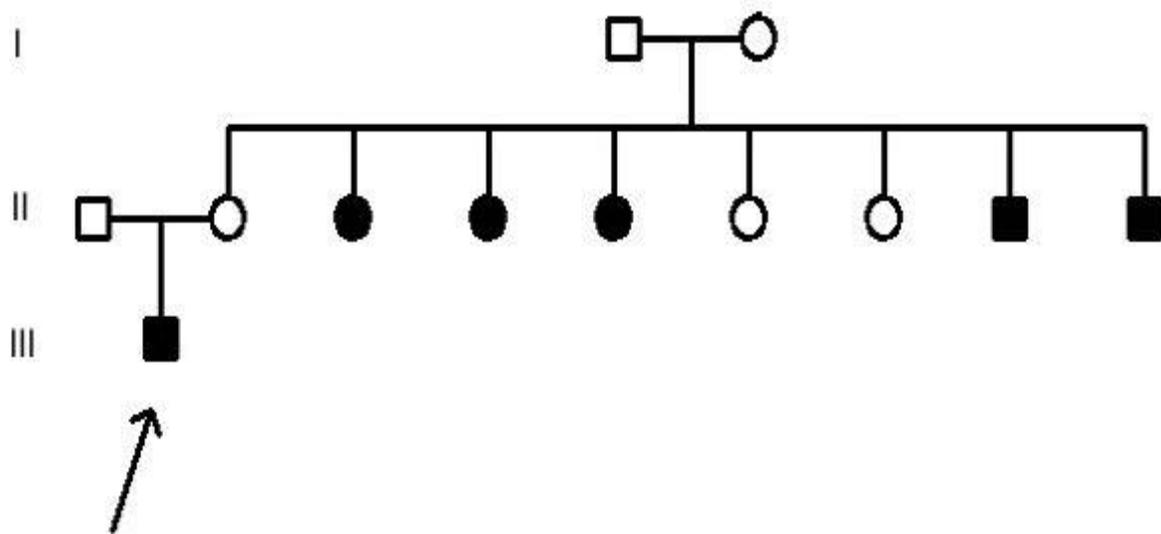
6 - EDV

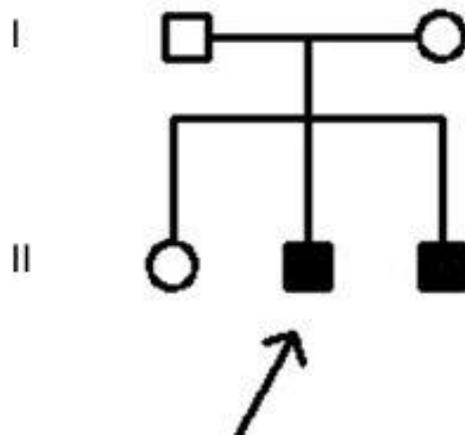
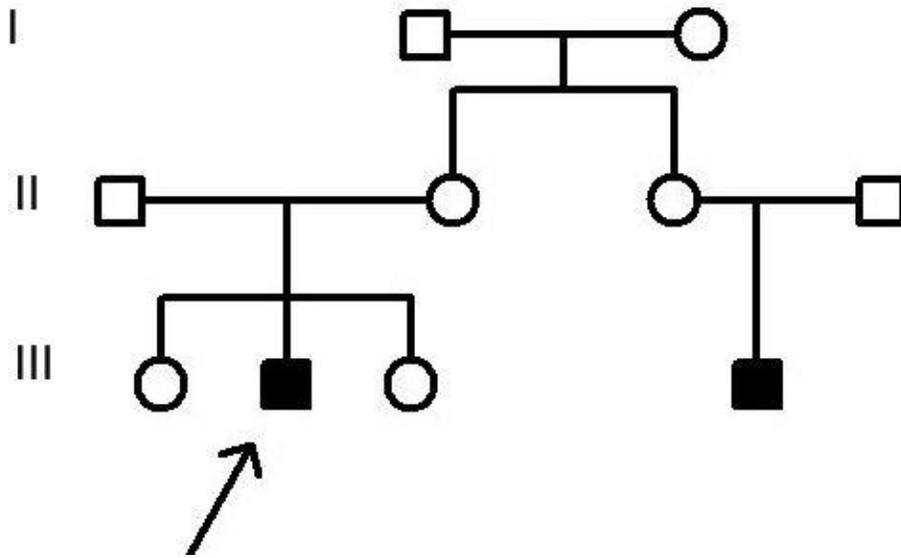


7 - RCS

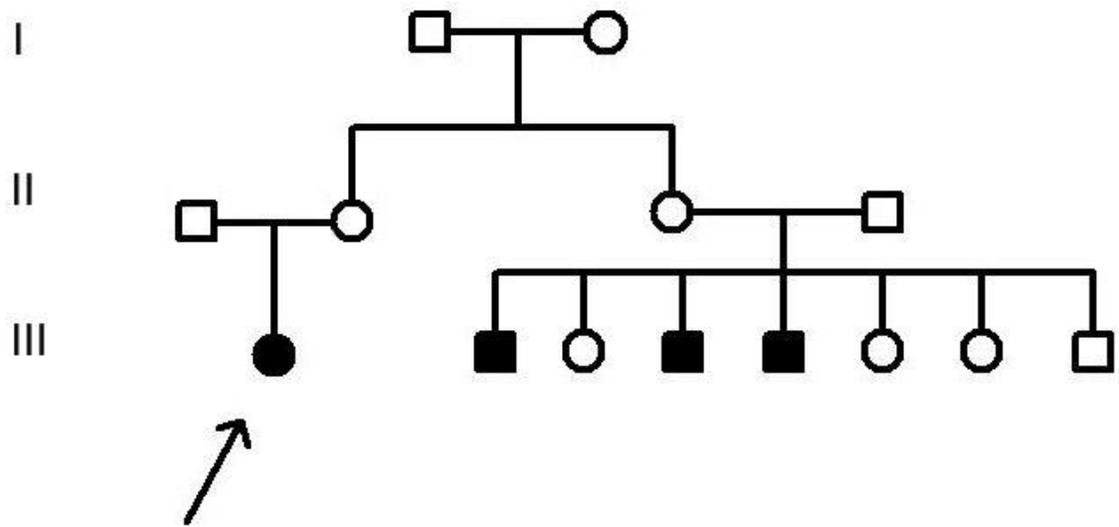


8 - EW

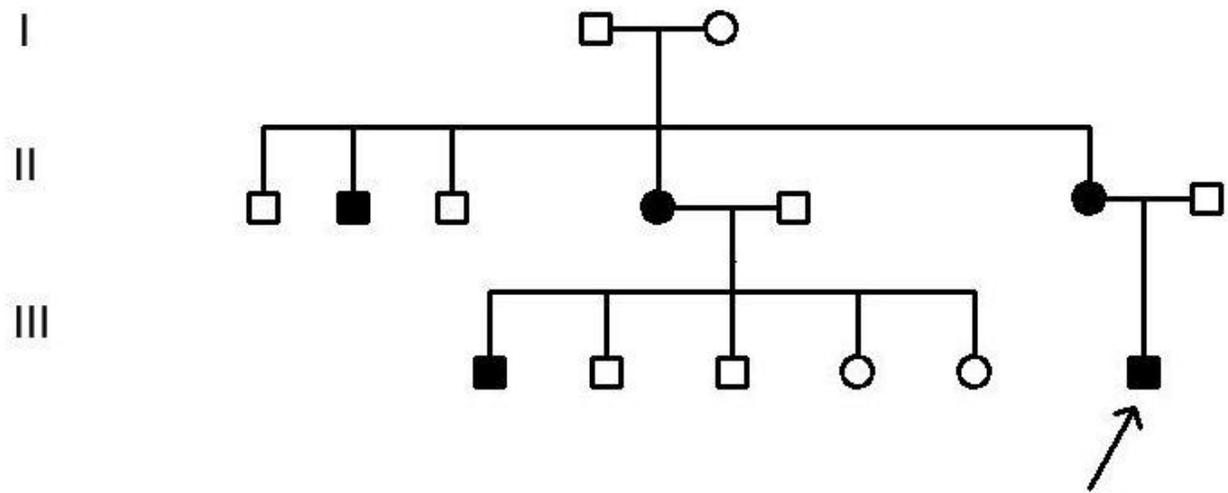




11 - ZSC

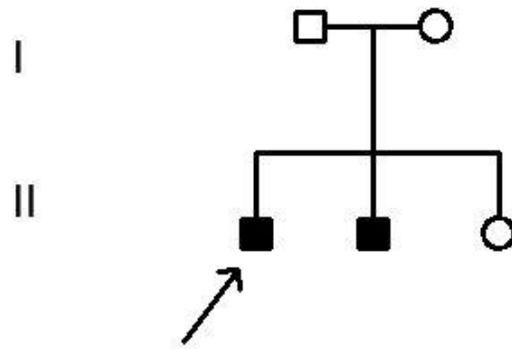


12 - AAGS



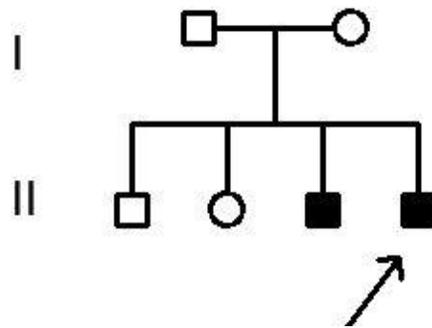
13 - VLS

---



14 - RSO

---





# **ANEXO**

---





UNICAMP

CEP, 31/08/09.  
(PARECER CEP: Nº 690/2004)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

2ª VIA

## PARECER

### I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDOS MOLECULAR DA NEUROPATIA ÓPTICA HEREDITÁRIA DE LEBER EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luciene Maria Zanchetta

### II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a inclusão do projeto “ANÁLISE DA INCIDÊNCIA DE MUTAÇÕES PRIMÁRIAS PARA NEUROPATIA ÓPTICA HEREDITÁRIA DE LEBER (LHON) EM PACIENTES COM NEUROPATIA ÓPTICA E CONSUMO ABUSIVO DE ÁLCOOL”, com a finalidade de mestrado, sob responsabilidade de Marcela Scabello Amaral Fernandes, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

### III - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de novembro de 2008.

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM/UNICAMP

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

