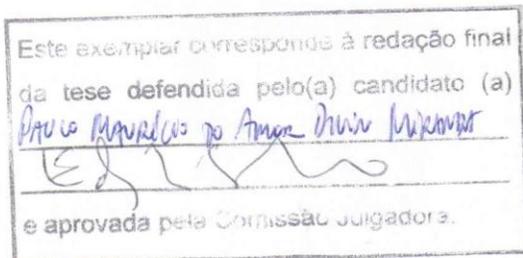


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



**PAULO MAURÍCIO DO AMÔR DIVINO MIRANDA**

**“ESTUDO MOLECULAR DA NEUROPATIA ÓPTICA  
HEREDITÁRIA DE LEBER EM PACIENTES  
BRASILEIROS”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**M672e**

Miranda, Paulo Maurício do Amor Divino  
Estudo molecular da Neuropatia Óptica Hereditária de  
Leber em pacientes brasileiros / Paulo Maurício do Amor  
Divino Miranda. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Edi Lúcia Sartorato.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Atrofia Óptica Hereditária de Leber. 2. Mutação  
(Biologia). 3. DNA mitocondrial. I. Sartorato, Edi Lúcia.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Molecular study of Leber's Hereditary Optic Neuropathy in brazilian patients.

**Palavras-chave em inglês:** Leber Hereditary Optic Atrophy; Mutation (Biology); Mitochondrial DNA.

**Área de concentração:** Genética Animal e Evolução.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Edi Lúcia Sartorato, Mônica Barbosa de Melo, Camila Andréa de Oliveira.

**Data da defesa:** 24/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

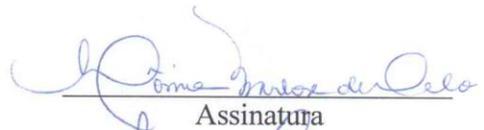
Campinas, 24 de fevereiro de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

Profª. Drª. Edi Lúcia Sartorato (Orientadora)

  
Assinatura

Drª. Mônica Barbosa de Melo

  
Assinatura

Profª. Drª Camila Andréa de Oliveira

  
Assinatura

Drª. Fabiana Alexandrino

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

\_\_\_\_\_  
Assinatura

"A coisa mais bela que podemos vivenciar é o mistério. Ele é fonte fundamental de toda verdadeira arte e de toda ciência. Aquele que não o conhece e não mais se maravilha, paralisado em êxtase, é como se estivesse morto: seus olhos estão fechados. Eu quero saber como Deus pensa. O resto... são detalhes."

Albert Einstein

*À minha esposa e razão de viver Izabela*

*Aos meus amigos e família.*

## ***AGRADECIMENTOS***

À Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato pela confiança, pelas oportunidades, por toda a paciência, por me ensinar muito sobre responsabilidade, respeito, iniciativa e caráter. Agradeço principalmente por fazer parte do meu crescimento, não só profissional, mas também pessoal.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrea Trevas Maciel-Guerra por todo o apoio, atenção, simpatia e disposição para ajudar todas as vezes que precisei.

À Doutora Marcela Scabello pela atenção, pelo carinho, pela amizade e por todo o cuidado que teve comigo sempre que precisei de ajuda.

À minha esposa Maria Izabela Neves Miranda, que sempre esteve comigo, desde lá do comecinho, quando ainda estávamos separados fisicamente, mas unidos virtualmente e principalmente pelo coração. Sempre tive um ombro amigo, uma companheira, uma pessoa que sempre me incentivou e serviu de inspiração para eu chegar onde estou. Muito obrigado por ser a minha vida.

Aos meus pais: minha mãe Cristina e meu pai o “Mestre Miranda”, pois mesmo sem ter condições me deram aquilo que eles nunca tiveram na vida e conseguiram me ajudar a ser a pessoa que sou hoje.

Aos demais membros da minha família: meus irmãos Enilson, Rosane, Rita e Edenilson; meus sobrinhos Jorge, Lorena, Isis, Isabela, Matheus, João Victor, Melissa, Pedrinho e Geisa; Aos meus cunhados Marivaldo, Ademir, Marina, Rosângela, Tuxê, Tiago e Lú; e a minha sogra Didina Neves. Agradeço a todos pelo carinho, pelo companheirismo e por mostrar sempre o significado da palavra “família”.

Às minhas amigas/irmãs de sempre Vanessa (Vanzuda) e Bruna, por todos esses anos de amizade, aos conselhos, por todas as risadas, por todos os momentos sérios e divertidos e por serem amigas que sempre pude e sempre poderei contar.

Aos Bazukas: Zelo (Zelão Bazuka), Creyto (Creytão Marreta) e Diego (Didi Pilão). Por toda ajuda, por todos os conselhos, pelas conversas, por todas as trocas de conhecimento e pelo companheirismo construído nesses anos de amizade.

A todos os amigos(as)/companheiros(as) que estão ou passaram pelo laboratório e que de alguma forma contribuíram, ajudaram, incentivaram e me ensinaram muitas coisas nessa minha caminhada. Com essas pessoas eu passei a maior parte do tempo nos últimos 4 anos, dividi alegrias e tristezas, vivemos momentos de conquistas e frustrações, mas acima de tudo, cada um de vocês acrescentou alguma coisa na minha vida que levarei comigo para todo o sempre. Claro que tenho que citar cada um de vocês: a Pequena Graviola Nath, Flávia Elfo, a Suelosa (sempre com conselhos valiosos), Dê Tamagóxi, Carol Paraná, Mari Codorna, Luíza, Ana Ervilha, Pri Zonzini, Pri II, Cintia, Xuxa, Reginaldo, Flávia Flor, Renata Sol, Helena, Gilmar, Dai, Mara Guaraná (obrigado pela ajuda na tradução), Débora, Helena, Luli (ao Heitor e a Helena), Jú Magali, Fer II, Fer III, Vanessinha, Gleice, Fer IV, Carolzinha, Uiara, Rodrigo, Creidy, Creuza, Paula (por ter me ensinado muita coisa), Jéssica, Carol Lincon, Renan, Francine, Milena, Vitor, Eduardo Fido, Luciene, Renata, Dra Juliana, Caio, Ianik (viva ao Guaraná Jesus) e aos alunos do CAF2010 Allan, Vanessa, Carol Conti e Carol Ferraz . Vocês representam bem o que é a variabilidade genética, pois todos me ensinaram que pessoas muito diferentes, de vários lugares, com costumes e culturas super variados podem conviver juntas, respeitando as diferenças e aprendendo sempre um com o outro, mas o principal é que cada um de vocês tem algo de único e especial.

À Dra. Maricilda, não somente pelo exemplo de profissionalismo, mas também pelo caráter. Apesar de eu ainda ter um pouquinho de vergonha quando chego perto dela, sempre admirei pela profissional e principalmente por ser uma pessoa sempre acessível e sempre disposta a ajudar.

Aos sempre competentes funcionários do CBMEG, em especial às meninas da secretária Tânia, Sandra e Andressa. Claro que não posso esquecer de agradecer muito à minha “mãe” Madá, pois me ensinou tudo com muito carinho e de um jeito especial que só ela tem.

A todos os técnicos, alunos de iniciação, mestrandos, doutorandos, pós doutorandos e professores que de certa forma me ajudaram em algum momento da escalada. Em especial ao Dr Márcio e a Dani por ajudas sempre bem vindas no sequenciador. Também agradeço à Dra Laura pelas agradáveis conversas e pelos conselhos que sempre recebi com muito respeito e atenção.

À Profa. Dra Cláudia Maurer-Morelli, e ao Dr. Arthur Menino Castilho pela contribuição na qualificação

Ao Dr. Marcelo Ribeiro por ter aceitado o convite. Apesar de não conhecê-lo pessoalmente, sempre ouvi coisas muito boas ao seu respeito. É uma honra para mim tê-lo na banca.

À Dra. Fabiana Alexandrino por ser uma pessoa que desde que entrei no laboratório, além de ter medo dela no começo, sempre admirei. Pois é, o medo passou (um pouco rs), mas a admiração e o respeito continuam. E claro que tenho que agradecer por aceitar o convite de fazer parte da pré-banca e da banca..

À Dra. Camila Andréa Oliveira, por ser uma pessoa que sempre me passou segurança, sempre mostrou ser uma pessoa agradável e uma ótima profissional. É um prazer ter alguém como a Camila fazendo parte da minha banca. Obrigado por ter aceitado o convite.

À Dra Mônica Barbosa de Melo por estar acompanhando esta escalada desde a qualificação, passando pela pré-banca e finalizando na Defesa. Sempre foi muito atenciosa e prestativa, dando conselhos e ajudando no desenrolar do trabalho. É muito gratificante quando uma pessoa assim faz parte da nossa caminhada. Agradeço por mais uma vez ter aceitado o convite.

Às agências financiadoras CAPES e FAPESP

# SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	x
RESUMO.....	xxxiii
ABSTRACT.....	xxxvii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>1.1 O olho humano e a perda visual .....</b>	<b>43</b>
1.1.1 O olho humano .....	43
1.1.2 A perda visual.....	46
<b>1.2 A Mitocôndria.....</b>	<b>50</b>
<b>1.3 Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON).....</b>	<b>56</b>
1.3.1 Mutações primárias .....	60
1.3.1.1 Mutação primária G11778A no gene <i>MT-ND4</i> .....	60
1.3.1.2 Mutação primária T14484C no gene <i>MT-ND6</i> .....	63
1.3.1.3 Mutação primária G3460A no gene <i>MT-ND1</i> .....	65
1.3.2 Mutações secundárias .....	67
1.3.3 A Neuropatia Óptica Hereditária de Leber no Brasil .....	68
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>73</b>
2.1 Objetivo geral .....	73
2.2 Objetivos específicos .....	73
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
3.1 Casuística .....	77
3.2 Métodos.....	78
3.2.1 Extração do DNA genômico de sangue periférico .....	78
3.2.2 Rastreamento de mutações primárias.....	80
3.2.2.1 Mutação G11778A no gene <i>MT-ND4</i> .....	80
3.2.2.2 Mutação T14484C no gene <i>MT-ND6</i> .....	82
3.2.2.3 Mutação G3460A no gene <i>MT-ND1</i> .....	84

3.2.3 Rastreamento das mutações secundárias .....	86
3.2.3.1. Amplificação das regiões de interesse .....	86
3.2.3.2. Gene <i>MT-ND1</i> - mutações T4160C e C4171A.....	86
3.2.3.3. Gene <i>MT-ND4</i> - mutações T11253C e G11696A.....	87
3.2.3.4. Gene <i>MT-ND4L</i> - mutação T10663C .....	89
3.2.3.5. Gene <i>MT-ND5</i> - mutações A13637G e G13730A .....	89
3.2.3.6. Gene <i>MT-ND6</i> - Mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A.....	90
3.2.3.7. Gene <i>MT-CYB</i> - Mutação G15257A.....	91
3.2.4. Seqüenciamento automático .....	92
3.2.4.1. Purificação dos produtos de PCR .....	92
3.2.4.2 Reação de seqüenciamento automático para produto de PCR.....	92
3.2.4.3 Análise das seqüências obtidas .....	94
3.3 - Rastreamento de mutações primárias por DHPLC (cromatografia líquida desnaturante de alta performance) .....	94
4. RESULTADOS.....	99
4.1 Rastreamento das Mutações Primárias.....	99
4.1.1 Mutação G11778A no gene <i>MT-ND4</i> .....	99
4.1.2 Mutação T14484C no gene <i>MT-ND6</i> .....	100
4.1.3 Mutação G3460A no gene <i>MT-ND1</i> .....	101
4.2 Rastreamento de Mutações Secundárias.....	102
4.3 Outras alterações encontradas .....	103
4.3.1 Alteração C4167T no gene <i>MT-ND1</i> .....	103
4.3.2 Alteração T11697C no gene <i>MT-ND4</i> .....	104
4.3.3 Alteração G11719A no gene <i>MT-ND4</i> .....	106
4.3.4 Alteração G14560A no gene <i>MT-ND6</i> .....	107
4.4 Padronização da técnica de DHPLC para a indicação de mutações primárias .....	112
4.4.1 Mutação G11778A.....	112
4.4.2 Mutação T14484C .....	113

4.4.3 Mutação G3460A.....	113
5. DISCUSSÃO .....	117
6. CONCLUSÃO .....	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXO .....	145

# **LISTA DE TABELAS**

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Complexos enzimáticos que compõem a cadeia respiratória mitocondrial.....	52
<b>Tabela 2</b> - Dezessete principais mutações mitocôndrias relacionadas à LHON e seus respectivos genes .....	60
<b>Tabela 3</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região 11778 do gene <i>MT-ND4</i> ..	80
<b>Tabela 4</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região 11778 do gene <i>MT-ND4</i> ..	82
<b>Tabela 5</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região 3460 do gene <i>MT-ND1</i> ..	84
<b>Tabela 6</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região em que foram rastreadas as mutações T4160C e C4171A no gene <i>MT-ND1</i> . .....	86
<b>Tabela 7</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região em que foi investigada a mutação T11253C no gene <i>MT-ND4</i> . .....	87
<b>Tabela 8</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região em que foi investigada a mutação G11696A no gene <i>MT-ND4</i> .....	88
<b>Tabela 9</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região em que foi investigada a presença da mutação T10663C no gene <i>MT-ND4L</i> .....	89
<b>Tabela 10</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região em que foram rastreadas as mutações A13637G e G13730A no gene <i>MT-ND5</i> . .....	90
<b>Tabela 11</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região que foram rastreadas as mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A no gene <i>MT-ND6</i> .....	90

<b>Tabela 12</b> – Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região em que foi rastreada a mutação G15257A no gene <i>MT-CYB</i> . .....	91
<b>Tabela 13</b> – Resumo dos resultados encontrados para o rastreamento das mutações primárias. ....	99
<b>Tabela 14</b> - Mutações secundárias e outras alterações encontradas nos fragmentos dos genes estudados. ....	108
<b>Tabela 15</b> – Resumo dos resultados obtidos para o rastreamento das mutações primárias e mutações secundárias. ....	110

# **LISTA DE FIGURAS**

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ilustração de um corte longitudinal do olho humano evidenciando suas principais estruturas.....	46
<b>Figura 2</b> - Ilustração representando a transmissão de doença mitocondrial seguindo o padrão de herança materna .....	53
<b>Figura 3</b> - Ilustração da dupla cadeia de DNA mitocondrial, evidenciando a cadeia pesada (H) e cadeia leve (L).....	54
<b>Figura 4</b> – Comparação entre duas imagens do exame de fundoscopia mostrando (A) fundo do olho normal e (B) fundo do olho na fase aguda da LHON apresentando pseudoedema do disco óptico, hiperemia, dilatação arteriolar e tortuosidade vascular. ....	58
<b>Figura 5</b> - Posição do Gene <i>MT-ND4</i> no DNA mitocondrial.....	61
<b>Figura 6</b> - Posição da mutação G11778A no gene mitocondrial <i>MT-ND4</i> . ....	62
<b>Figura 7</b> - Posição do Gene <i>MT-ND6</i> no DNA mitocondrial.....	63
<b>Figura 8</b> - Posição da mutação T14484C no gene mitocondrial <i>MT-ND6</i> .....	64
<b>Figura 9</b> - Posição do Gene <i>MT-ND1</i> no DNA mitocondrial.....	65
<b>Figura 10</b> - Posição da mutação G3460A no gene mitocondrial <i>MT-ND1</i> . ....	66
<b>Figura 11</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11778A.....	81
<b>Figura 12</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T14484A .....	83
<b>Figura 13</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G3460A.....	85
<b>Figura 14</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações T4160C e C4171A.....	87
<b>Figura 15</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T11253C. ....	88
<b>Figura 16</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11696A.....	88
<b>Figura 17</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T10663C. ....	89
<b>Figura 18</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações A13637G e G13730A. ....	90

<b>Figura 19</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A. ....	91
<b>Figura 20</b> - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G15257A. ....	92
<b>Figura 21</b> – Ciclos utilizados no seqüenciamento. ....	93
<b>Figura 22</b> - Padrão de bandas para a mutação G11778A. ....	100
<b>Figura 23</b> – Padrão de bandas para a mutação T14484C ....	101
<b>Figura 24</b> – Padrão de bandas para a mutação G3460A. ....	102
<b>Figura 25</b> – Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando a mudança da base C no paciente normal para a base T no paciente que apresentou a alteração C4167T. ....	103
<b>Figura 26</b> - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. ....	104
<b>Figura 27</b> – Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando a mudança da base T no paciente normal para a base C no paciente que apresentou a alteração T11697C. ....	105
<b>Figura 28</b> - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração T11697C. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração. ....	106
<b>Figura 29</b> – Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando a mudança da base G no paciente normal para a base A no paciente que apresentou a alteração G11719A. ....	106
<b>Figura 30</b> - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração. ....	107
<b>Figura 31</b> – Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando a mudança da base G no paciente normal para a base A no paciente que apresentou a alteração G14560A. ....	108
<b>Figura 32</b> - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração. ....	108
<b>Figura 33</b> – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida dos controles normal e mutante, separados e misturados, da mutação G11778A na temperatura de 56,6°C. ....	112
<b>Figura 34</b> – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida dos controles normal e mutante, separados e misturados, da mutação T14484C na temperatura de 55,1°C. ....	113

**Figura 35** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida dos controles normal e mutante, separados e misturados, da mutação G3460 na temperatura de 63,3°C. ....114

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Acetil-CoA</b>	Acetilcoenzima A
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>AV</b>	Acuidade Visual
<b>DHPLC</b>	<i>Desnaturing high-performance liquid chromatography</i> - cromatografia líquida desnaturante de alta performance
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamono Tetracético
<b>FAD</b>	Dinucleotídeo adenina-flavina
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleotídeo adenina-flavina oxidada
<b>g</b>	Grama
<b>Kb</b>	Quilobase
<b>L</b>	<i>Ladder</i>
<b>LHON</b>	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber
<b>M</b>	Mutante
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mtDNA</b>	DNA Mitocondrial
<b>MT-CYB</b>	Gene mitocondrial do Complexo Citocromo b-c1
<b>MT-ND1</b>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 1
<b>MT-ND4</b>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4
<b>MT-ND4L</b>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4L
<b>MT-ND5</b>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 5
<b>MT-ND6</b>	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 6
<b>N</b>	Normal
<b>NAD</b>	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida
<b>NADH</b>	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida oxidada
<b>ng</b>	Nanograma

<b>NO</b>	Neuropatia óptica adquirida de origem desconhecida
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OXPHOS</b>	Fosforilação oxidativa
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RPM</b>	Rotações Por Minuto
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)
<b>TBE</b>	Trisma, Base de Trishidroximetil-metano, Ácido Bórico, EDTA
<b>TE</b>	Tris EDTA
<b>Tm</b>	Temperatura de <i>melting</i> (fusão)
<b>U</b>	Unidade
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μg</b>	Micrograma
<b>(H)</b>	Cadeia pesada do DNA Mitocondrial
<b>μL</b>	Microlitro
<b>(L)</b>	Cadeia leve do DNA Mitocondrial
<b>°C</b>	Graus centígrados

# RESUMO

---

## RESUMO

Nos seres humanos, a visão é o sentido que retrata com melhor fidelidade o ambiente que os cerca. A ausência do sentido da visão é definida como cegueira. As consequências da cegueira são problemas de saúde pública importantes, pois têm um impacto significativamente negativo sobre o desenvolvimento econômico e social dos indivíduos afetados. A perda visual pode ser resultado de lesão nos centros nervosos superiores, nas vias ópticas ou em estruturas do próprio olho. As causas vão desde traumas oculares até doenças congênitas, como: glaucoma congênito, catarata congênita e Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON). A LHON é uma doença, causada por alterações no DNA mitocondrial, caracterizada pela perda repentina da visão em ambos os olhos, devido a uma degeneração do nervo óptico. Atualmente, 17 principais mutações associadas à LHON foram registradas, onde três dessas mutações representam 95% dos casos (mutações primárias) e as 14 mutações subsequentes representam apenas 5% do total (mutações secundárias). Não foram relatados, até o momento, estudos que definam a frequência das mutações ou estudos populacionais de prevalência no Brasil. Desta forma, o presente estudo teve como principal objetivo definir a frequência das mutações da LHON em pacientes brasileiros. Foram avaliados 55 pacientes com hipótese diagnóstica de LHON ou neuropatia óptica adquirida de origem desconhecida. Mutações primárias (G11778A, T14484C e G3460A) e mutações secundárias nos genes *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6* e *MT-CYB* foram rastreadas em todos os indivíduos estudados. O rastreamento das mutações primárias foi realizado pelo método de restrição enzimática. Para os pacientes que não apresentaram mutações primárias procedeu-se o seqüenciamento direto para rastrear mutações secundárias. O método de DHPLC foi padronizado para o rastreamento de mutações primárias. Mutações primárias foram encontradas em 19 pacientes, ou seja, em 38,2% dos casos. A frequência dessas mutações ficou definida como: 67% da mutação G11778A (13 casos), 28% da mutação T14484C (5 casos) e 5% da mutação G3460A (apenas 1 caso). A mutação G11778A apresentou números próximos aos encontrados nas populações estudadas em outras partes do mundo, confirmando ser a principal causa de LHON também em pacientes brasileiros. A mutação T14484C, como na maioria das populações mundiais, mostrou-se como a segunda maior causa da LHON, porém mostrou uma frequência quase duas vezes maior que o descrito na literatura. Enquanto que a mutação G3460A apresentou frequência muito baixa se comparada as das demais populações estudadas. Não foram encontradas mutações secundárias. A ausência dessas mutações pode ser atribuída à possibilidade de haver mutações em regiões do DNA mitocondrial não rastreadas no presente estudo. Há também a possibilidade de os pacientes em que não foram localizadas mutações não serem portadores da LHON, apresentando outra anomalia com dados clínicos semelhantes. No presente estudo também foi possível, a partir do teste molecular a confirmação da hipótese diagnóstica de LHON em alguns pacientes.

**ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

The vision is the sense that best expresses the environment surrounding the mankind. The term blindness is used to define the absence of the vision. The consequences of blindness are important problems of public health concern as they cause a negative impact on the economic and social development of the affected individuals). The visual loss is characterized by congenital deprivation and it can be total or partial, permanent or temporary. Furthermore, visual loss may result from superior nerve centers damage, optic pathways lesions or physic damage of the eye itself. Thus, the visual loss causes range from trauma to ocular congenital diseases such as congenital glaucoma, congenital cataract and Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON). LHON is a mitochondrial disease characterized by sudden loss of vision in both eyes, due to an optic nerve degeneration. Currently, 17 main LHON associated mutations were published, three of which account for 95% of the cases (primary mutations) and the subsequent fourteen account for only 5% of the total (secondary mutations). The frequencies of mutations involved in LHON in Brazilian patients have not been reported so far. Therefore, the aim of this study was to define the LHON mutations frequency in Brazilian patients. We evaluated 55 patients with LHON diagnosis or acquired optic neuropathy of unknown origin. Primary mutations (G11778A, T14484C and G3460A) and secondary mutations in the genes *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6* and *MT-CYB* were screened in all individuals studied. Screening of primary mutations was performed by the method of enzyme restriction. Patients who did not have primary mutations were screened for secondary mutations by direct sequencing. The DHPLC method was used for primary mutations screening. Primary mutations were found in 19 patients, ie 38.2% of cases. The frequency of these mutations was defined as 67% for the G11778A mutation (13 cases), 28% for the T14484C mutation (5 cases) and 5% for the G3460A mutation (only 1 case). The mutation G11778A showed numbers similar to those found in the populations studied in other parts of the world, confirming that the main cause of LHON also in Brazilian patients. The T14484C mutation, as in most world populations, showed up as the second leading cause of LHON, but it showed a frequency almost twice that reported. While the G3460A mutation frequency showed very low compared to the other populations studied. No secondary mutation was found. The absence of these mutations can be attributed to the possibility of mutations in mitochondrial DNA regions not screened in this study. There is also the possibility that patients in whom no mutations were not found to be carriers of LHON, with another anomaly with similar clinical data. This study evaluated the situation of primary and secondary mutations associated with LHON in a sample of Brazilian individuals. It was also possible, from the molecular testing to confirm the diagnosis of LHON in some patients.

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - O olho humano e a perda visual

#### 1.1.1 O olho humano

A visão é considerada por muitos o mais importante dos sentidos humanos, pois é o que retrata com maior precisão o ambiente externo. E, embora pareça ser algo simples, tem alto grau de sensibilidade, complexidade e desenvolvimento evolutivo.

O órgão responsável pela visão é o olho, também conhecido como globo ocular. O olho humano é um instrumento altamente especializado, delicado e coordenado. Cada uma de suas estruturas tem um papel específico no processo sofisticado de captação, desvio, focalização e transformação da luz em imagens visuais.

Os olhos humanos estão localizados e protegidos dentro de proeminências ósseas. Também conhecidas como órbitas, essas cavidades ósseas são compostas de partes dos ossos frontal, maxilar, zigomático, esfenóide, etmóide, lacrimal e palatino. As pálpebras são formadas por um tecido músculo-fibroso, revestidas externamente por pele e internamente pela membrana conjuntiva. Nas bordas das pálpebras estão os cílios, pêlos que também têm função de proteção, já que não permitem que excesso de luz em determinadas ocasiões entrem nos olhos e evitam que partículas estranhas cheguem ao globo ocular. Localizadas acima dos olhos e concluindo o sistema básico de proteção ocular, estão as sobrancelhas, essas não permitem que quantidades relativas de suor, ou qualquer outro líquido ou partícula que desça pela testa entre em contato com os olhos (Dantas, 1995; Sobotta, 2000).

Os músculos extra-oculares são seis e se situam ao redor do globo ocular. Sua contração, que pode ser controlada voluntariamente, permite ao olho rodar em qualquer direção e aumentar, assim, o campo visual em torno de 180 graus (Gray, 1998).

Além das estruturas já citadas, o globo ocular apresenta três camadas concêntricas aderidas entre si com a função de visão, nutrição e proteção. São elas: camada externa (constituída pela membrana conjuntiva, pela esclera e pela córnea e serve também para proteção), camada média (ou vascular, é formada pela íris, a coróide, o cório e o corpo ciliar) e camada interna (constituída pela retina que é a parte nervosa) (Sobotta, 2000).

O olho é preenchido por humores intra-oculares, que mantêm pressão suficiente no globo ocular para que fique distendido e com formato esférico. Esses humores podem ser divididos em duas porções: humor aquoso e humor vítreo. O equilíbrio entre a formação e a reabsorção do humor aquoso regula o volume total e a pressão do líquido intra-ocular (Dantas, 1995; Netter, 2000).

A membrana conjuntiva ou túnica conjuntiva é uma membrana mucosa presente nos olhos que reveste a parte interna da pálpebra e a superfície exposta da esclerótica, tendo a função de defesa da superfície ocular contra agentes externos e a manutenção da lubrificação ocular. Após a membrana conjuntiva, do exterior para o interior, está a esclera, que é uma túnica externa branca, opaca e fibrosa (fibras de colágeno e elastina) do globo ocular. Por ter uma consistência mais rígida, a esclera é responsável pela manutenção da forma do olho e pela proteção das estruturas oculares. A córnea é a parte da camada externa do olho que tem como funções principais a proteção da parte anterior do globo ocular, realização da transmissão e refração da luz, além de funcionar como uma lente que, associada ao cristalino, compõe o sistema óptico responsável por focalizar as imagens na retina. O cristalino tem a importante função de regular o foco dos objetos conforme a distância que eles se situam do olho, permitindo a visão precisa de objetos próximos e distantes. (Dantas, 1995; Sobotta, 2000).

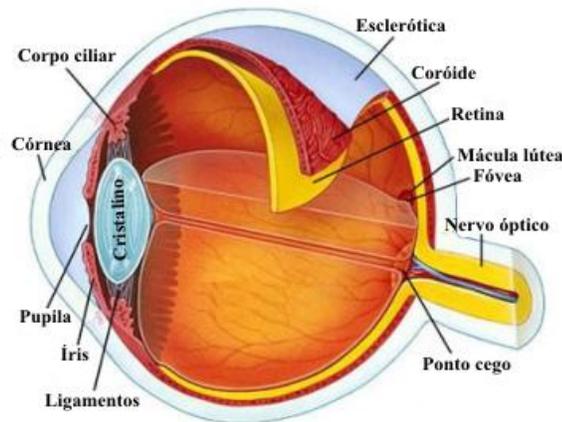
A íris tem a função de controlar a intensidade de luz que penetram no globo ocular, pois está localizada no seu centro a pupila. A pupila é uma pequena abertura por onde passam os raios luminosos oriundos do meio externo. O tamanho da pupila é determinado pela contração e relaxamento dos músculos da íris e varia conforme a necessidade

momentânea de luz. Se há pouca luz no ambiente a pupila se dilata para que mais luz chegue ao interior do olho. Por outro lado, quando há muita luminosidade a pupila se contrai e não permite que muita luz chegue à retina (Newell, 1996; Guyton et al., 1997).

A retina é a camada que envolve internamente cerca 75% do globo ocular e talvez tenha o papel mais importante na formação da visão. Ela é composta por milhares de células fotossensoras. Estas células especializadas são divididas em cones e bastonetes. Os cones são responsáveis por proporcionar visão em cores. Enquanto os bastonetes são os que tornam possível a visão noturna e em preto e branco (Dantas, 1995). A retina, na sua área periférica, oferece uma acuidade visual de apenas 1/10 ou 20/200 que é uma visão deficiente. No fundo da retina, ligeiramente localizada para o lado temporal, está mácula lútea. A mácula é formada por duas camadas de células ganglionares e é nela que se encontra a maior densidade de células cone do olho, responsáveis pela visão de cores. No centro da mácula está localizada a fóvea central. Nela há o encontro focal dos raios paralelos que penetram no olho. Por esse motivo a fóvea é de suma importância para a visão, pois a acuidade visual, nela obtida, é de 20/20, ou seja, a acuidade ideal para a geração da visão considerada perfeita. Quanto mais distante da fóvea, menor será a concentração de cones, conseqüentemente menor vai ser a acuidade visual. A fóvea é composta por cones para a cor amarela, outros para a vermelha e outros para a verde. Também no fundo da retina e ao lado da fóvea está localizado o ponto cego. O ponto cego é assim chamado porque nessa região não existem receptores sensoriais responsáveis pela resposta aos estímulos. Essa região tem como função ligar a retina ao nervo óptico. (Dantas, 1995; Newell, 1996; Sobotta, 2000).

Ligado à retina através do ponto cego, o nervo óptico é um grupo de fibras nervosas, de forma tubular, com algumas artérias. Sua função é exclusivamente sensitiva, pois conduz a luz captada pela retina e fóvea para o córtex cerebral, ou seja, transporta as sensações visuais do olho para o cérebro (Aumont, 1995; Netter, 2000).

A figura 1 mostra um resumo esquemático das principais estruturas que formam o olho humano.



**Figura 1** - Ilustração de um corte longitudinal do olho humano evidenciando suas principais estruturas.

Modificado de [http://www.alemanoftalmologia.com.br/images/anatomia\\_olho\\_g.jpg](http://www.alemanoftalmologia.com.br/images/anatomia_olho_g.jpg)

Em resumo, o processo de formação da imagem se inicia quando a luz atinge a córnea. Em seguida a luz passa através do humor aquoso, penetrando no globo ocular pela pupila, atingindo imediatamente o cristalino que funciona como uma lente de focalização que converge os raios luminosos para um ponto focal sobre a retina, mais precisamente na região da fóvea. Na retina, mais de cem milhões de células fotossensíveis (cones e bastonetes) transformam a luz em impulsos eletroquímicos, que são enviados ao cérebro pelo nervo óptico. No cérebro, mais precisamente no córtex visual, ocorre o processamento das imagens recebidas pelo olho direito e esquerdo completando então nossa sensação visual (Aumont, 1995; Dantas, 1995; Guyton et al., 1997; Sobotta, 2000; Netter, 2000).

### 1.1.2 – A perda visual

A função visual pode ser dividida em quatro níveis segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), são eles: a visão normal, a deficiência visual moderada, a deficiência visual grave e a cegueira. Esses níveis são determinados pela Acuidade Visual (AV). Ela é determinada pela menor imagem retiniana percebida pelo indivíduo e sua medida é dada

pela relação entre o tamanho do menor objeto (optotipo) visualizado e a distância entre observador e objeto. Essa medida objetiva da quantidade de visão é representada em uma fração onde o numerador é 20 (distância em pés entre o observador e o objeto, que convertido representa 6 metros) e o denominador é o tamanho do optotipo. Quanto maior for o denominador menor será a acuidade. Um indivíduo que tenha uma AV próxima de 20/20 terá uma visão considerada normal. Se essa acuidade for para uma fração 20/60 estará caracterizada a deficiência visual. Porém, se a acuidade for igual ou inferior a 20/400 a condição será definida como cegueira (Carlson et al., 1990; Cline et al., 1997; Dandona e Dandona, 2006).

A cegueira é a falta do sentido da visão. Ela é caracterizada pela privação congênita ou perda, parcial ou total, transitória ou permanente da visão, que pode decorrer de lesão no próprio olho, nas vias ópticas ou nos centros nervosos superiores, causadas de formas diversas, que vão desde doenças congênitas até traumas oculares. Algumas das principais causas da cegueira são: doenças relacionadas à idade; doenças autoimunes; doenças degenerativas; doenças infecciosas, como por exemplo, oncocercose e tracoma; doenças sistêmicas, como diabetes, doenças nutricionais e hipertensão arterial; traumas oculares, como pancadas, ação de corpos estranhos ou substâncias; e causas congênitas como malformações oculares, glaucoma congênito, catarata congênita e neuropatia óptica hereditária de Leber (Souza e Rodrigues, 1997; Cimerman e Cimerman, 1999; Orssaud, 2003; Neves, 2005;).

Salomão e colaboradores, em 2009, afirmam que as conseqüências da cegueira são um problema de saúde pública importante, pois têm um impacto significativamente negativo sobre o desenvolvimento econômico e social dos indivíduos afetados e, conseqüentemente, da sociedade. Estudos descrevem as principais conseqüências psicopatológicas que a maioria dos pacientes que perdem a visão enfrenta, divididas em fases: a primeira fase é a da descrença, onde o paciente tende a negar a sua cegueira; a segunda fase é a do protesto, fase essa que o indivíduo procura uma segunda opinião e não aceita utilizar objetos ou outras formas de auxílio (bengala ou braile); e por fim, a terceira e

mais preocupante fase que é a de depressão, onde o paciente já tem a total noção de que não voltará a enxergar, por isso deixa de viver normalmente (se afasta das outras pessoas e das atividades que realizava antes da perda visual), tem alteração no apetite e no peso, e, em alguns casos, cogita a possibilidade de suicídio. Além dessas três fases, ainda existe a fase de recuperação, que é quando o paciente aceita a cegueira. Essa última fase pode acontecer após as três fases citadas ou em qualquer outro momento. Também é importante ressaltar que a quantidade de tempo para acontecer a aceitação é diretamente proporcional às possibilidades de se desenvolver um distúrbio psicopatológico mais grave e/ou irreversível (Fitzgerald, 1970 ; Cholden 1984).

Em 2004, Resnikoff e colaboradores afirmaram que cerca de 37 milhões de pessoas com cegueira e 124 milhões de pessoas com deficiência visual em todo o mundo. Já em março de 2009 a OMS afirmou que existem cerca de 314 milhões de pessoas com alguma deficiência visual em todo o mundo, sendo que 45 milhões deles são cegos. Em qualquer parte do mundo a maioria dessas pessoas é idosa, e as mulheres apresentam maior risco em todas as idades. Aproximadamente 85% dos casos de cegueira no mundo acontecem em países em desenvolvimento, onde a maioria dos indivíduos perdeu a visão por causa de doenças que, em cerca de 75% dos casos, são evitáveis ou possuem tratamento, deixando assim 25% dos casos para doenças em que não existe cura (Congdon et al., 2003 ; Pizzarello et al., 2004). Fazendo uma projeção baseada em vários estudos, dentre eles o de Frick e Foster (2003), a Organização Mundial de Saúde (OMS) resalta que, se não ocorrerem intervenções adicionais, o número de casos de cegueira no mundo aumentará para aproximadamente 76 milhões até o ano de 2020. Os principais fatores para desencadear o aumento desses números são o crescimento populacional, o aumento da expectativa de vida, a escassez de serviços especializados, as dificuldades de acesso da população à assistência oftalmológica, as dificuldades econômicas e a ausência/insuficiência de esforços educativos que promovam a adoção de comportamentos preventivos. Além desses fatores, também é esperado o aumento de doenças que possam comprometer a visão da população (Temporini e Kara-José, 2004; Resnikoff et al.2004; Salomão et al., 2009).

Segundo a OMS, as causas mais freqüentes que levam à cegueira infantil são glaucoma congênito, a retinopatia da prematuridade, a rubéola, a catarata congênita, a toxoplasmose congênita, a hipovitaminose A, a oncocercose, o sarampo e o tracoma. Em adultos são outros fatores que podem causar a cegueira, cada um deles, com suas implicações psicológicas e emocionais. Entre os mais freqüentes estão a catarata, diabetes, descolamento de retina, glaucoma, retinopatias e causas acidentais. A OMS fez um levantamento recente sobre as principais causas de perda visual no mundo em todas as faixas etárias e afirma que apesar dos progressos nas técnicas cirúrgicas em muitos países durante os últimos anos, a catarata (47,9%) continua a ser a principal causa de deficiência visual em todas as áreas do mundo, exceto em países desenvolvidos. A OMS também relata que em 2002 as outras principais causas de deficiência visual foram o glaucoma (12,3%), degeneração macular relacionada à idade (8,7%), opacidades corneanas (5,1%), retinopatia diabética (4,8%), cegueira na infância (3,9%), tracoma (3,6%), e oncocercose (0,8%) (Resnikoff et al., 2004).

No ano 2000, um estudo realizado no Brasil por Kara-José e Arieta estimou que 0,4 a 0,5% da população sofrem com a perda visual, isto é, de 4 a 5 mil pessoas por milhão de habitantes. Também no ano 2000, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgou que 16,6 milhões de pessoas apresentam algum grau de deficiência visual, quase 150 mil se declararam cegos no território nacional. Nesse mesmo ano o IBGE também divulgou que a região Sudeste, apesar de ter população superior à outras regiões, ficou em segundo lugar no número de pessoas cegas, com 54600, perdendo o primeiro lugar para a região Nordeste: 57.400 cegos. São Paulo foi o estado com o maior número de cegos, com 23.900, seguido pela Bahia, com 15.400. Levando em consideração que nesse mesmo ano a população brasileira era de cerca de 160 milhões de habitantes e que nesse intervalo até chegar nos dias atuais o número de casos de cegueira aumentou gradativamente, estima-se que nos dias de hoje haja algo em torno de 640.000 cegos no país. A estimativa da prevalência de cegueira no Brasil sofre variações em termos de diferentes níveis socioeconômicos existentes em áreas mais, ou menos desenvolvidas. Pode-se, assim,

estimar a prevalência de 0,25% em locais semelhantes a países desenvolvidos e de 0,75% em áreas mais pobres economicamente. Segundo o Ministério da Saúde, em 2002 as principais causas de perda visual no país eram, em primeiro lugar, a catarata (cegueira reversível), seguida por retinopatia diabética e glaucoma (perdas visuais irreversíveis), respectivamente em segundo e terceiro lugar.

François, em 1980, afirmou que mais de 50% de todas as doenças relacionadas à visão eram devidas a um fator genético. Mais tarde, no ano 2000, dados da Academia Americana de Oftalmologia (American Academy of Ophthalmology) indicam que 90% de doenças médicas possuem um componente genético importante que podem influenciar o seu desenvolvimento. Fatores genéticos são evidentes na maioria das doenças oculares, como glaucoma, estrabismo, miopia, degeneração macular, catarata e neuropatia óptica (Orssaud, 2003; Rosemberg, 2003). A maioria dos pacientes que possuem doenças relacionadas a fatores genéticos não apresenta problemas clinicamente graves. No entanto, alguns podem apresentar alterações mais graves que poderiam resultar em cegueira e exigem correto aconselhamento genético para um tratamento mais adequado (Rim et al., 2006). Dentre as diversas manifestações de doenças que causam cegueira de origem genética, várias delas têm procedência no DNA mitocondrial. A retinite pigmentosa, a catarata congênita e a neuropatia óptica hereditária de Leber são exemplos de doenças causadas por alterações genéticas na mitocôndria (Guerrero et al., 1998; Simon et al., 1999; Orssaud, 2003).

## **1.2 - A Mitocôndria**

As mitocôndrias, organelas citoplasmáticas encontradas em todas as células eucarióticas, são partículas esféricas e alongadas, que podem medir de 0,5 a 1 micron de largura e até 10 micra de comprimento. Apesar do tamanho, são essenciais para o funcionamento celular, pois são responsáveis pela execução de funções vitais dentro da célula. Dentre essas funções podem ser destacadas a biossíntese de aminoácidos, a oxidação de ácidos graxos, o ciclo do ácido cítrico, e principalmente a transformação de energia

química dos metabólitos citoplasmáticos em energia acessível à célula (Nardin e Johns, 2001). Energia esta que é acumulada em componentes, como o trifosfato de adenosina (ATP), para ser usada quando a célula necessitar de energia para trabalho químico, mecânico, osmótico ou elétrico (Wallace et al., 1999; Carvalho et al., 2002).

A geração de energia na mitocôndria começa quando, através do ciclo do ácido cítrico, a acetil-CoA (acetilcoenzima A), dos ácidos graxos e carboidratos, é oxidada 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, conhecida como fosforilação oxidativa (OXPHOS), gera a energia necessária para o funcionamento celular (Nardin e Johns, 2001).

Este processo ocorre na membrana mitocondrial interna, que pode ser separada em cinco complexos enzimáticos responsáveis pela OXPHOS, denominados complexos I, II, III, IV e V (Tabela 1). Os complexos respiratórios contêm ainda subunidades que são codificadas pelo DNA nuclear, as quais são sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos e, depois, importadas para as mitocôndrias. A ATP é formada a partir de ADP (difosfato de adenosina) + Pi (fosfato inorgânico) produzida pela energia livre gerada pelo 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. O ATP formado é então trocado por ADP através da membrana mitocondrial interna, sendo que o

ADP pode ser ressintetizado em ATP. (Champe et al., 1997; Junqueira e Carneiro, 1999; Wallace et al., 1999; Nardin e Johns, 2001).

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

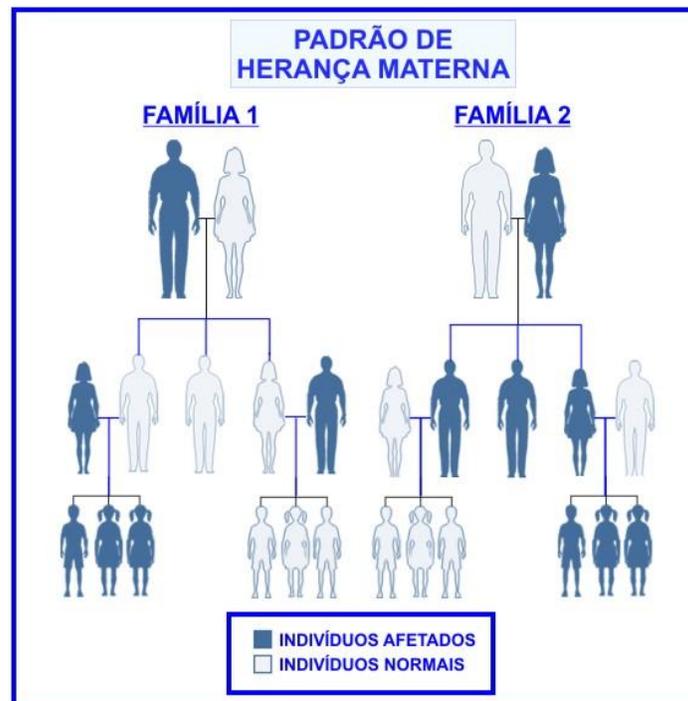
<b>Complexo Enzimático</b>	<b>Número de Subunidades Nucleares</b>	<b>Número de Identificações das Subunidades Mitocondriais</b>
I - (NADH) - coenzima Q óxido-redutase	Aproximadamente 40	7 (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6)
II - succinato desidrogenase-CoQ-óxido-redutase	4	0
III - coenzima Q citocromo C óxido-redutase	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, RJPp: 189-195, 2001.

Alberts, em 1994, relatou que o número de mitocôndrias varia entre as células, indo geralmente de quinhentas a até dez mil dessas estruturas por célula. Esse número tem uma variação de acordo com o organismo e o tecido em que essas células se encontram, mas também será diretamente proporcional à atividade metabólica de cada uma (VOET et al., 2006).

Uma característica singular da mitocôndria em relação às outras organelas é a presença de um DNA específico: o DNA Mitocondrial (Chan, 2006). O DNA mitocondrial (mtDNA), foi descrito por Van Bruggen, Sinclair e Stevens e Nass em 1966, mas só foi seqüenciado na sua totalidade em 1981, por Anderson e colaboradores. Com características próprias, o mtDNA é semi-autônomo, possui um sistema independente de replicação, transcrição e tradução do seu genoma, mas o mecanismo de reparação é dependente do DNA nuclear. Outra característica muito importante é que a herança envolvida no processo

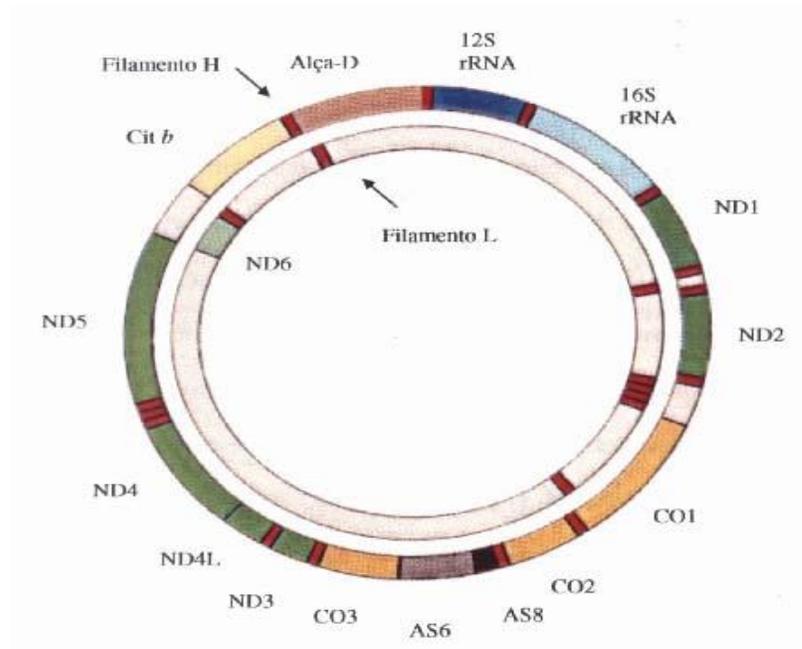
de transmissão do material do mtDNA é materna, ou seja, o DNA mitocondrial é herdado da mãe, porque as mitocôndrias presentes no espermatozóide estão localizadas na cauda deste, que não penetra no óvulo durante a fecundação. Esse fato evidencia que os descendentes herdem doenças mitocondriais apenas das mães (Figura 2) (Howell et al., 2000; Carvalho et al., 2002; De Robertis, 2003; Scharfe et al., 2009).



**Figura 2** - Ilustração representando a transmissão de doença mitocondrial seguindo o padrão de herança materna. Modificado de <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Mitochondrial.jpg>

O mtDNA representa de 1 a 2% do DNA celular. Ele codifica aproximadamente 10% das proteínas constitutivas das mitocôndrias, como consequência, para um bom funcionamento destas, é necessária uma boa cooperação entre o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial. Ele possui organização circular e apresenta 16.569 pares de bases organizados que codificam RNAs ribossômicos grandes (16S, MTRNR2) e pequenos (12S, MTRNR1) e também 22 RNAs transportadores. Polipeptídeos (13 no total) são traduzidos

por estes RNAs estruturais. Essas proteínas codificadas são componentes essenciais de 4 dos 5 complexos responsáveis pela fosforilação oxidativa mitocondrial. O complexo II é formado exclusivamente por subunidades codificadas pelo nDNA . O genoma mitocondrial é compacto e sem íntrons, composto por uma dupla fita circular (Figura 3). As fitas de mtDNA tem 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, enquanto que a cadeia H codifica os 28 genes restantes, do total de 37 genes do mtDNA (Góes, 2003).



**Figura 3** - Ilustração da dupla cadeia de DNA mitocondrial, evidenciando a cadeia pesada (H) e cadeia leve (L). Retirada de [http://lh4.ggpht.com/\\_qMjyQbD0xtc/SzwuV4ygFAI/AAAAAAAAAN A/L1ExCxJAOIU/mtDNA2.jpg](http://lh4.ggpht.com/_qMjyQbD0xtc/SzwuV4ygFAI/AAAAAAAAAN A/L1ExCxJAOIU/mtDNA2.jpg)

Na divisão celular, as mitocôndrias se dividem por fissão simples e são distribuídas de forma aleatória para as células-filhas. Uma propriedade interessante da mitocôndria é a presença de várias cópias de mtDNA dentro de cada célula, característica essa chamada de Poliplasmia. Uma célula pode conter mtDNA mutante e normal simultaneamente, essa condição é conhecida como heteroplasmia. Quando uma célula com mtDNA heteroplásmico se divide, suas células-filhas podem conter mtDNA com heteroplasmia,

podem conter apenas mtDNA normal ou apenas mtDNA mutante, sendo esses dois últimos casos chamados de homoplasmia. A grande parte das alterações malélicas no mtDNA são heteroplásmicas, enquanto que os polimorfismos não patogênicos são homoplásmicos (Nardin e Johns, 2001; Carvalho et al., 2002).

O mtDNA pode apresentar dois grupos distintos de mutações: os rearranjos e as mutações de ponto. Os rearranjos, que na maioria das vezes não são passados para as gerações futuras, são subdivididos em deleções, onde há a exclusão de nucleotídeo de um determinado locus, e duplicações, onde há a adição de um nucleotídeo em um determinado locus. Já as mutações de ponto geralmente podem ser herdadas pelo lado materno. Elas podem consistir em substituição de aminoácidos (condição mais rara descrita em algumas doenças neurológicas e oftalmológicas) e substituição de nucleotídeos, onde o nucleotídeo de um determinado locus é substituído por outro, por exemplo, o nucleotídeo adenina ser substituído pela guanina, ou o nucleotídeo citosina pela timina. Além destas formas de mutações citadas, também pode ser encontrado um tipo raro de mutação chamado depleção, isto é, redução drástica de genes do mtDNA, que leva geralmente a uma condição letal (Tono et al., 1998; Smith et al., 1999; Carvalho et al., 2002).

O DNA mitocondrial possui alta taxa de mutação, isso eleva consideravelmente o número de manifestações sistêmicas e neurológicas relacionadas a essas alterações. São descritas diversas manifestações sistêmicas, dentre elas podem ser citadas a acidose láctica, anemia sideroblástica, baixa estatura, cataratas e opacidades de córnea, diabetes mellitus, disfunção pancreática exócrina, hepatopatia, hiperaldosteronismo, hipogonadismo, hipoparatiroidismo, hipotiroidismo, miocardiopatia, pancitopenia, pseudo-oclusão intestinal, transtornos do sistema de condução do coração e tubulopatias renais. E dentre as manifestações neurológicas, são encontradas a cefaléia vascular, convulsões, demência, depressão, distonia, mioglobinúria recorrente, episódios apoplexiformes, mielopatia, mioclonia, miopatia, nistagmo, oftalmoplegia, ataxia, retinopatia pigmentar, surdez e neuropatia (Guerrero et al., 1998; Marriage et al., 2003; Scharfe et al., 2009).

Segundo Yu-Wai-Man e colaboradores (2009), dentre os principais fenótipos associados ao mtDNA estão doenças que ocasionam comprometimento da visão. Principalmente levando a uma disfunção do nervo óptico. As neuropatias ópticas mais comuns encontradas na prática clínica são a atrofia óptica autossômica dominante e a neuropatia óptica hereditária de Leber,

### **1.3 - Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON)**

A neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), também conhecida como atrofia óptica de Leber, foi descrita pela primeira vez em 1871 pelo oftalmologista alemão Teodor Leber. Ele estudou indivíduos de quatro famílias distintas, e a princípio descreveu a LHON como uma súbita perda de visão em homens jovens com um histórico familiar de cegueira (Leber, 1871).

A LHON é uma doença mitocondrial caracterizada pela perda bilateral da visão devido à degeneração das células ganglionares da retina e dos axônios que formam o nervo óptico e leva a uma perda aguda ou subaguda da visão central (Battisti et al., 2004).

Mesmo a idade dos pacientes podendo variar consideravelmente, a LHON afeta geralmente adultos jovens, com uma idade de início situada entre os 18 e 35 anos de idade. Os indivíduos afetados são geralmente assintomáticos até que se desenvolva embaçamento visual que afeta o campo central da visão em um dos olhos, sintomas similares aparecem no outro olho. A perda de visão ocorre geralmente em um dos olhos, de forma súbita em um período de tempo que, em alguns casos, pode durar menos de uma semana (perda aguda) ou de forma progressiva ao longo de 60 a 90 dias (perda subaguda). O outro olho pode ser afetado quase simultaneamente em cerca de 25% dos casos, ou posteriormente, por vezes com um intervalo que pode atingir 9 meses, geralmente quando o primeiro olho passa a mostrar palidez do disco óptico. A acuidade visual é severamente reduzida, podendo chegar a valores inferiores à 20/400. Também é possível observar a dicromatopsia, ou seja,

anomalia que interfere na percepção das cores (Biousse e Newman, 2001; Orssaud, 2003; Yu-Wai-Man e Chinnery, 2008).

Alguns pacientes podem sentir dor durante a perda da visão, mas na grande maioria dos casos ela é indolor (Huoponen, 2001). Indivíduos do sexo masculino, na maioria dos casos, são os mais acometidos, apresentando uma perda aguda ou subaguda da visão bilateral quatro vezes mais freqüente que os do sexo feminino (Yu-Wai-Man e Chinnery, 2008). O porquê desse fato ocorrer ainda não foi esclarecido, mas uma hipótese é que as mutações do mtDNA por si só não sejam suficientes para que ocorra a expressão fenotípica da LHON. O que é sugerido é que genes nucleares, localizados no cromossomo X, interagem no desenvolvimento da maior incidência dos efeitos da doença em homens (Bu e Rotter 1991).

Após apresentação do quadro clínico característico, o diagnóstico pode ser baseado em exames oftalmológicos, como: angiofluoresceinografia, para identificar alterações vasculares características na fase aguda; perimetria de Goldmann ou uma técnica semelhante, para identificar a presença de escotoma central ou escotoma centrocecal característico; estudos eletrofisiológicos, para confirmar disfunção do nervo óptico e ausência de doenças na retina; imagem craniana, para excluir outras causas compressivas, infiltrativas e inflamatórias de neuropatia óptica bilateral; e oftalmoscopia ou fundoscopia é o exame do fundo do olho realizado para detectar alterações na retina (Yu-Wai-Man e Chinnery, 2008). No caso da LHON, o exame oftalmológico revela alterações do reflexo pupilar e do campo visual, podendo ocorrer também alterações no fundo do olho, onde a fundoscopia revela telangiectasias peripapilares, pseudo-edema do disco óptico e hiperemia, dilatação arteriolar e tortuosidade vascular de arteríolas de tamanho médio (Figura 4). Embora a perda de visão seja em geral a única manifestação, está descrita a associação de LHON com anomalias cardíacas, neurológicas e esqueléticas. (Kerrison et al., 1999; Biousse e Newman, 2001; Orssaud, 2003).



**Figura 4** – Comparação entre duas imagens do exame de fundoscopia mostrando (A) fundo do olho normal e (B) fundo do olho na fase aguda da LHON apresentando palidez, pseudo-edema do disco óptico, hiperemia, dilatação arteriolar e tortuosidade vascular. A - Modificado de [http://www.alemanoftalmologia.com.br/images/fundo\\_olho\\_normal\\_g.jpg](http://www.alemanoftalmologia.com.br/images/fundo_olho_normal_g.jpg); B- Retirado de <http://jmg.bmj.com/content/46/3/145/F1.medium.gif>

A doença mitocondrial é considerada a mais freqüente na população caucasóide, tendo uma prevalência estimada em 1:50000, segundo Orssaud (2003). Outro estudo realizado mostra que a prevalência da LHON no nordeste da Inglaterra é de 1:31000 indivíduos, sendo que 1:8500 deles são portadores de alto risco de perda visual. Valores bastante similares foram relatados em outras populações caucasianas, com uma prevalência de 1:39000 na Holanda e 1:50000 na Finlândia. Na Austrália, 2% das pessoas com registro de cegueira são portadoras da LHON (Mackey e Buttery, 1992; Man et al., 2003; Spruijt et al., 2006; Puomila et al., 2007).

Alguns autores sugerem que as formas mais graves da LHON apresentem as mutações em homoplasmia. Estudos comprovam também que em uma mesma família pode haver indivíduos com material genético em estado homoplásmico e indivíduos heteroplásmicos. É relatado que as taxas de mitocôndrias que apresentam mutações podem variar em diferentes regiões do organismo, o que pode dificultar o diagnóstico molecular, já que a maioria dos testes são realizados em sangue periférico (Mroczek-Tonska et al., 2002; Man et al., 2003)

Alguns fatores têm sido descritos como complicadores ou até desencadeadores dos sintomas da LHON. O álcool, o tabaco, as doenças auto-imunes, a exposição a solventes orgânicos, o uso de drogas para o tratamento de outras doenças e carências nutricionais, como a falta da vitamina B12 no organismo, e podem estar relacionados à progressão mais rápida e/ou grave da doença (Ikeda et al., 2006; Pott e Wong, 2006; Yu-Wai-Man et al., 2009).

Em 2002, Man afirmou que o número de mutações mitocondriais relacionadas à LHON era dezessete. No ano de 2009, Yu-Wai-Man e colaboradores relataram vinte e uma mutações importantes. Entretanto, o número de mutações relacionadas a LHON é controverso na literatura científica.

De todas as mutações rastreadas, três delas são denominadas mutações primárias, pois apresentam um maior risco de expressão fenotípica e pelo menos uma delas está presente em 95% dos indivíduos portadores de LHON. Mutações consideradas raras foram relatadas em 5% dos casos e receberam o nome de mutações secundárias. São justamente nas mutações secundárias que os autores divergem, pois apesar de muitas dessas mutações tenham sido descritas, a sua ocorrência é rara, a interpretação das alterações é complexa e os seus mecanismos de ação ainda não foram esclarecidos (Man e Chinnery, 2008; Yu-Wai-Man et al., 2009).

Mroczek-Tonska (2003) evidenciou que a maioria das mutações no mtDNA são encontradas em genes (Tabela 2) que codificam subunidades protéicas, na maioria dos casos nas NADH-desidrogenases, mas algumas mutações secundárias estão relacionadas a proteínas como Cytb, ATP6 e CO3.

**Tabela 2.** Principais mutações mitocôndrias relacionadas à LHON e seus respectivos genes

<b>Genes</b>	<b>Mutações Primárias</b>	<b>Mutações Secundárias</b>
<i>MT-ND1</i>	<b>G3460A</b>	<b>T4160C - C4171A</b>
<i>MT-ND4</i>	<b>G11778A</b>	<b>G11696A - T11253C</b>
<i>MT-ND4L</i>	-	<b>T10663C</b>
<i>MT-ND5</i>	-	<b>A13637G - G13730A</b>
<i>MT-ND6</i>	<b>T14484C</b>	<b>G14459A - C14482G - A14495G T14898C - C14568T - G14596A</b>
<i>MT-CYB</i>	-	<b>G15257A</b>

Man et al., 2002.

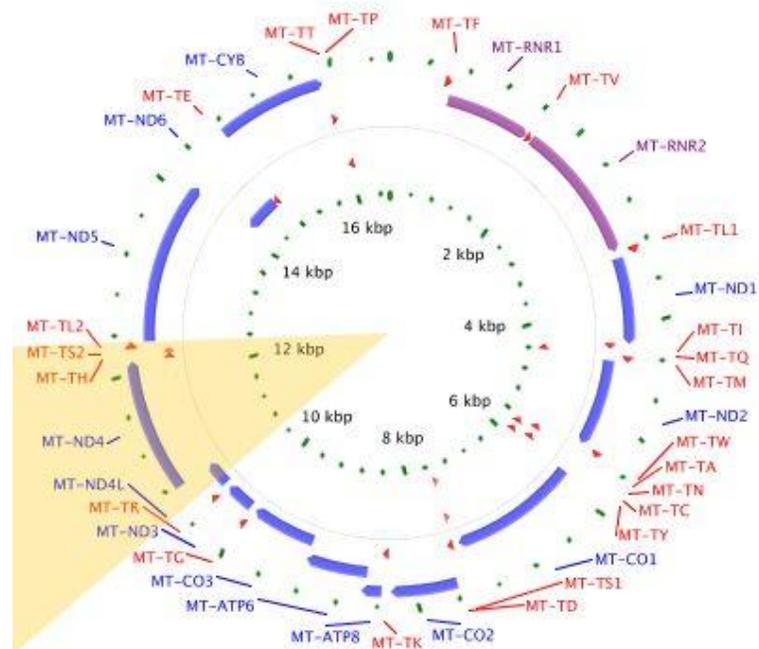
### **1.3.1 MUTAÇÕES PRIMÁRIAS**

As três mutações primárias são G11778A, T14484C e G3460A e como descrito anteriormente, estão presentes em 95% dos pacientes portadores da LHON. Essas mutações estão presentes nos genes *MT-ND1* (G3460), *MT-ND4* (G11778A) e *MT-ND6* (T14484C), genes esses que codificam subunidades do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (Mackey et al. 1996; Man e Chinnery, 2008).

#### **1.3.1.1 MUTAÇÃO PRIMÁRIA G11778A NO GENE *MT-ND4***

O gene mitocondrial *MT-ND4*, também conhecido como gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4, tem a função de fornecer instruções para codificar uma proteína chamada NADH desidrogenase 4. Esta proteína faz parte do complexo enzimático I (NADH - coenzima Q óxido-redutase), que é o responsável pela primeira etapa no processo de transporte de elétrons (Lenaz G, 2004; Michell et al., 2006).

O *MT-ND4* está localizado a partir da posição 10.760 até a posição 12.137 do mtDNA (Figura 5).



**Figura 5** - Posição do Gene *MT-ND4* no DNA mitocondrial. Modificado de [http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd4\\_highlight.jpg](http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd4_highlight.jpg)

Alterações genéticas no *MT-ND4* parecem interromper a função normal do complexo I, podendo ser fatores determinantes no aparecimento de doenças. Uma mutação no *MT-ND4* (mutação C11777A) foi identificada em um pequeno número de pessoas com síndrome de Leigh, uma desordem progressiva do cérebro que geralmente aparece na infância (Komaki H, 2003).

Porém, o que mais chama a atenção no *MT-ND4* é a presença da mutação mitocondrial que é a causa mais comum de LHON, correspondendo a 69% dos casos, a mutação G11778A. Em populações específicas, o número de portadores da mutação pode variar consideravelmente: 50% dos casos na Europa, 69% na Finlândia e quase 95% na população asiática (WALLACE e LOTT, 1993; NEWMAN et al., 1993; HUOPONEN; 2001 Yu-Wai-Man et al., 2009). Esta mutação, que pode ser escrito como G11778A ou Arg340His, troca uma guanina por uma adenina na posição 11778 do mtDNA (Figura 6), o

que acarreta na substituição do aminoácido histidina por uma arginina na posição 340 da proteína. Esta mutação tende a causar perda de visão mais severa, com pouca chance de recuperação. Em cerca de 4 a 25% dos casos há a probabilidade de melhora parcial da visão (Man e Chinnery, 2008).



**Figura 6** - Posição da mutação G11778A no gene mitocondrial *MT-ND4*. Modificado de [Http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd4\\_magnify.jpg](http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd4_magnify.jpg)

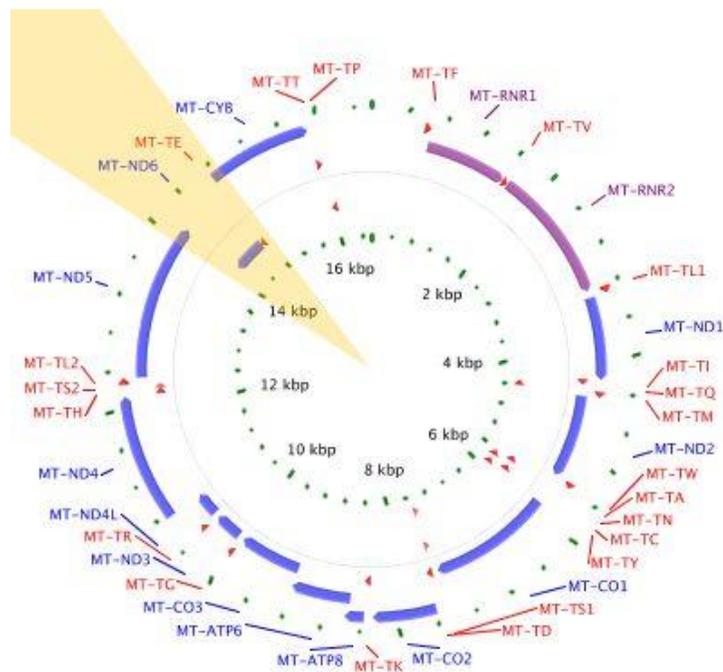
O mecanismo pelo qual a mutação G11778A causa a doença ainda não foi esclarecido. Alguns pesquisadores acreditam que as mudanças genéticas impedem o complexo I de interagir normalmente com ubiquinona, o que pode afetar a geração de ATP. Algumas teorias supõem que a mutação pode aumentar, dentro da mitocôndria, a produção de moléculas potencialmente prejudiciais, chamadas espécies reativas de oxigênio (EROS). Essas espécies reativas têm a propriedade de agir como poderosos agentes oxidantes que danificam todos os tipos de estrutura celular, desde lipídeos, membranas até DNA. Outra incógnita diz respeito aos efeitos destas mutações serem muitas vezes exclusivos ao nervo

óptico, sem na maioria das vezes gerar outra alteração aparente nas demais células do organismo (Bugiani, et al., 2004; Lenaz, 2004; Baracca et al., 2005; Michell et al., 2006).

### 1.3.1.2 - MUTAÇÃO PRIMÁRIA T14484C NO GENE *MT-ND6*

Também conhecido como gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 6, o *MT-ND6* tem a função de fornecer instruções para codificar uma proteína chamada NADH desidrogenase 6. Assim como a NADH desidrogenase 4, essa proteína também faz parte do Complexo I (Lenaz, 2004; Michell et al., 2006).

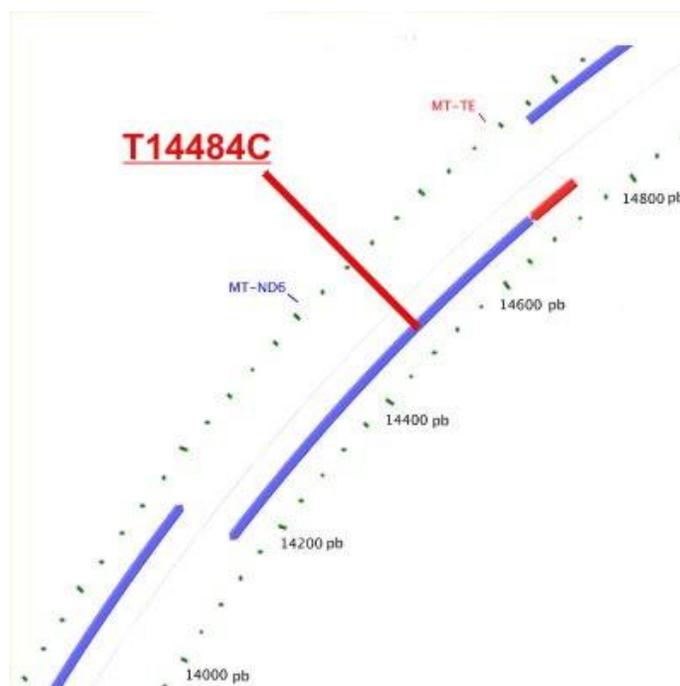
O gene *MT-ND6* está localizado a partir da posição 14.149 até a posição 14.673 do mtDNA (Figura 7).



**Figura 7** - Posição do Gene *MT-ND6* no DNA mitocondrial. Modificado de [http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd6\\_highlight.jpg](http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd6_highlight.jpg)

No gene *MT-ND6* está localizada a mutação mitocondrial T14484C. Essa mutação é a segunda mais freqüente na população mundial, onde é descrita em 14% dos casos. Os

mesmos 14% são encontrados na Finlândia (HUOPONEN; 2001 Yu-Wai-Man et al., 2009). Esta mutação, que pode ser escrito como T14484C ou Met64Val, troca uma timina por uma citosina na posição 14484 do mtDNA (Figura 8), o que como consequência substitui o aminoácido metionina por uma valina na posição 64 da proteína. Esta mutação tende a causar perda visual menos severa entre as três mutações primárias, com probabilidade de melhora parcial da visão de 37% a 58% dos casos pode haver pequena melhora na visão (Valentino et al., 2002; Man e Chinnery, 2008).



**Figura 8** - Posição da mutação T14484C no gene mitocondrial *MT-ND6*. Modificado de [http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd6\\_magnify.jpg](http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd6_magnify.jpg)

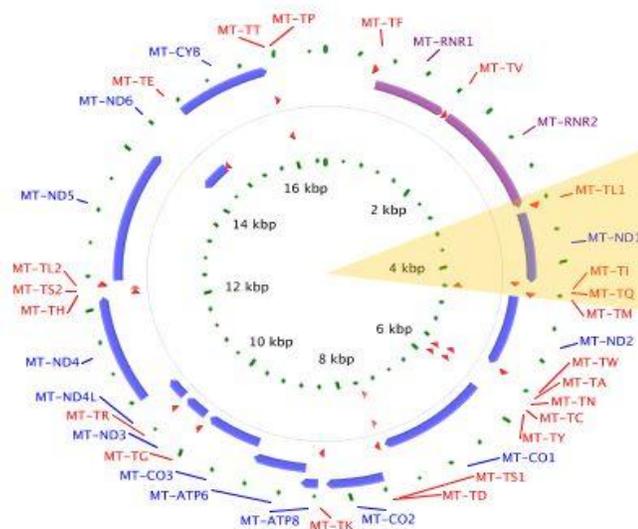
Outra alteração está presente no gene *MT-ND6*, em especial em pacientes com síndrome de Leigh, é a mutação G14459A. Além de causar a síndrome de Leigh, essa alteração, curiosamente, foi descrita também em pacientes com LHON e em indivíduos com o distúrbio do movimento denominado distonia, que envolve contrações musculares involuntárias, tremores, e outros movimentos descontrolados. Esta mutação provavelmente

altera o funcionamento do complexo I, comprometendo a atividade mitocondrial. Não se sabe, no entanto, como esta mutação está relacionada com as características específicas da síndrome de Leigh, LHON e/ou distonia. Também não está claro porque uma única mutação pode causar esses sinais e sintomas variados em diferentes pessoas (Kirby et al., 2000; Gropman et al., 2004; Tarnopolsky et al., 2004; Baracca et al., 2005).

### 1.3.1.3 - MUTAÇÃO PRIMÁRIA G3460A NO GENE *MT-ND1*:

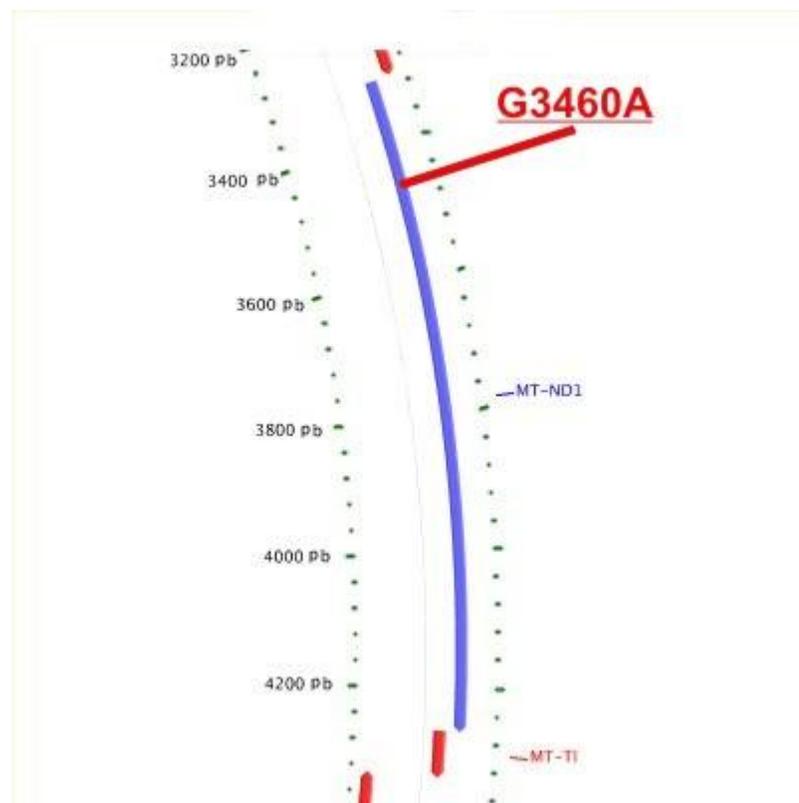
O gene mitocondrial *MT-ND1* ou gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 1, assim como os outros genes portadores das mutações primárias, codifica uma proteína que faz parte do complexo I, a NADH desidrogenase 1 (Lenaz, 2004; Michell et al., 2006).

O gene *MT-ND1* está localizado a partir da posição 3.307 até posição 4.263 do mtDNA (Figura 9).



**Figura 9** - Posição do Gene *MT-ND1* no DNA mitocondrial. Modificado de [http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd1\\_highlight.jpg](http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd1_highlight.jpg)

A mutação G3460A está presente no gene *MT-ND1*. A mutação é a menos freqüente dentre as três mutações primárias, ocorrendo em 13% dos pacientes estudados no mundo. Mais uma vez a população finlandesa apresenta números iguais e também relata a mutação G3460A em 13% dos indivíduos avaliados. Esta mutação é caracterizada pela troca de uma guanina por uma adenina na posição 3460 do mtDNA (Figura 10). Esta mutação tende a causar perda de visão intermediária, se comparadas com as outras mutações primárias. As probabilidades estão entre 20% e 25% de melhora parcial da visão (Newman et al., 1993; Cock et al., 1999; Huoponen; 2001; Man e Chinnery, 2008; Yu-Wai-Man et al., 2009).



**Figura 10** - Posição da mutação G3460A no gene mitocondrial *MT-ND1*. Modificado de [http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd1\\_magnify.jpg](http://ghr.nlm.nih.gov/html/images/chromosomeIdeograms/mitochondria/mtnd1_magnify.jpg)

São relatadas outras mutações no gene *MT-ND1*. Pelo menos cinco alterações no gene podem desencadear MELAS (Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e

episódios tipo AVC), porém as principais mutações relacionadas à doença estão localizadas em outros genes mitocondriais (Kirby et al., 2004; Kervinen et al., 2006).

Assim como no gene *MT-ND6*, uma alteração que causa a distonia também está presente no *MT-ND1*. A alteração encontrada é a mutação A3796G, onde uma adenina é substituída por uma guanina na posição 3796. Mas assim como em outras doenças citadas até então, o mecanismo de ação ainda não foi explicado (Simon et al., 2003).

### **1.3.2 - MUTAÇÕES SECUNDÁRIAS**

Mesmo contando com uma quantidade de mutações diferentes quase quatro vezes maiores que a quantidade de mutações primárias, as demais mutações, também conhecidas como mutações secundárias, representam apenas 5% das ocorrências das mutações mitocondriais relacionadas à LHON.

Existem muitas questões será serem respondidas sobre a LHON, apesar de ter sido descrita há muito tempo. Para esclarecer essas questões deve-se levar em consideração o padrão de herança, penetrância e mecanismos de desenvolvimento da doença (Mroczek-Tonska et al., 2003).

Yu-Wai-Man e colaboradores, em 2009, afirmaram que mutações secundárias são raras e geralmente, além da LHON, estão também associadas a síndromes e manifestações como arritmias cardíacas, tremor postural, neuropatia periférica, miopatias não-específicas e transtornos do movimento. Estudos realizados em linhagens isoladas na Holanda, Austrália e América do Norte mostram que mutações secundárias (A11696G e/ou T14596A, T4160C e G14459A, respectivamente) estão associadas a pacientes com LHON e outras alterações clínicas simultaneamente (Jun et al., 1994; De Vries et al., 1996; Gropman et al., 2004; Tarnolsky et al., 2004). Esse fato pode ser observado em estudos que

descreveram a sobreposição de características clínicas de LHON e MELAS em portadores das mutações G3376A ou G3697A (Blakely et al., 2005; Spruijt et al., 2007).

As mutações secundárias estão presentes em quase todos os genes que até hoje foram descritos como portadores das principais mutações, são eles o gene *MT-ND1* (mutações T4160C e C4171A), gene *MT-ND4* (T11253C e G11696A), gene *MT-ND4L* (T10663C), gene *MT-ND5* (A13637G e G13730A), gene *MT-CYB* (G15257A) e gene *MT-ND6* (G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A). Mas até o presente momento essas mutações ainda não têm ainda um papel definido na etiologia da neuropatia. Uma sugestão é a de que possam influenciar na progressão da doença ou a de que sejam marcadores polimórficos de diferentes haplogrupos (Nikoskelainen et al., 1996).

### **1.3.3 A NEUROPATIA ÓPTICA HEREDITÁRIA DE LEBER NO BRASIL**

No Brasil, os únicos registros de estudos moleculares da LHON com indivíduos brasileiros foram realizados por um grupo de pesquisadores formado por brasileiros, americanos e italianos em uma numerosa família do estado do Espírito Santo. Foram avaliadas cerca de 300 pessoas de sete gerações, sendo descrita apenas a mutação G11778A na maioria dos indivíduos (Sadun et al., 2002; Sadun et al., 2003; Quiros et al., 2006).

Até o momento dados sobre a frequência relativa e nem dados populacionais indicando a prevalência dessas mutações. Assim como, até o momento não existem informações sobre a presença das mutações secundárias da LHON em nosso meio.

Como o Brasil é um país que possui uma composição étnica heterogênea, é possível que as frequências das mutações primárias encontradas no território brasileiro sejam diferentes em relação as já documentadas em outras partes do mundo. Como já foi mencionado, as mutações secundárias são mais numerosas, porém são menos frequentes e, conseqüentemente, menos estudadas. São encontrados poucos registros na literatura mundial relacionados ao estudo desses tipos de mutações, e por isso não existe ainda um

papel definido na etiologia da neuropatia. Além disso, a análise molecular das mutações da LHON pode ser importante para a confirmação do diagnóstico em casos clínicos típicos de LHON em que não há antecedentes familiares positivos, e particularmente em casos de neuropatias ópticas atípicas, algumas das quais podem ser causadas por alguma das mutações da LHON.

O estudo das mutações mitocondriais primárias e secundárias pode ser útil também para o acompanhamento do prognóstico de cada paciente, pois a expressão fenotípica da LHON varia entre as diferentes mutações.

## **OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Definir a frequência das mutações primárias e secundárias em pacientes brasileiros portadores da Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON).

### 2.2 Objetivos específicos

#### I- Rastreamento das mutações primárias:

- G11778A no gene *MT-ND4*;
- T14484C no gene *MT-ND6*;
- G3460A no gene *MT-ND1*;

#### II- Detectar de 14 principais mutações secundárias:

A- No gene *MT-ND1*

- Mutações T4160C e C4171A

B- No gene *MT-ND4*

- Mutações T11253C e G11696A

C- No gene *MT-ND4L*

- Mutação T10663C

D- No gene *MT-ND5*

- Mutações A13637G e G13730A

E- No gene *MT-ND6*

- Mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A

F- No gene *MT-CYB*

- Mutação G15257A

#### III- Validar o método de DHPLC para o rastreamento das mutações primárias

- Mutações G11778A, T14484C e G3460A

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

De acordo com as normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos, resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente estudo foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médica - UNICAMP (Parecer 690/2004, Anexo 1).

Pacientes com hipótese diagnóstica de LHON ou com neuropatia óptica adquirida de origem desconhecida foram acompanhados no Centro de Estudos e Pesquisa em Reabilitação (CEPRE) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) ou no Ambulatório de Oftalmologia do Hospital das Clínicas Central da UNICAMP.

Os indivíduos com hipótese diagnóstica de LHON, que foram selecionados para o estudo seguiam a exigência de ter evolução clínica e quadro oftalmológico compatíveis com a doença. Em todos os casos o acometimento foi bilateral, com manifestação simultânea na maioria deles. As primeiras manifestações clínicas variaram entre 14 e 47 anos, ocorrendo em média aos 25 anos de idade. O tempo médio entre o início e o fim da perda visual bilateral foi de um a quatro meses.

Já os pacientes com suspeita de neuropatia óptica de origem desconhecida tinham que apresentar características de evolução clínica e/ou de achados oftalmológicos não típicos de LHON e que tivesse recorrência familiar de neuropatia óptica com padrão de herança materno. A idade do início das manifestações foi de aproximadamente 37 anos. Em todos os casos o acometimento foi bilateral.

Após passarem por avaliações clínicas e testes oftalmológicos, foram selecionados 55 casos-índice, já que havia pacientes com grau de parentesco. Desses 55 casos-índice, 17 apresentaram hipótese diagnóstica de LHON e 38 demonstraram serem portadores de neuropatia de origem desconhecida.

## 3.2 Métodos

O estudo molecular foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp.

### 3.2.1 Extração do DNA genômico de sangue periférico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de leucócitos obtidos em 10 a 15mL de sangue periférico coletado em tubos *Vacutainer* contendo EDTA (etilenediaminotetracetato dissódico.2H<sub>2</sub>O) 10%, de acordo com o protocolo adaptado pelo Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG:

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 ressuspenso 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 ressuspendido 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. Homogeneizou-se a mistura 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, v:v:v) e por último com por uma solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v:v).

Para precipitação do DNA, foi acrescentado 0,1 do volume de acetato de sódio 3 M 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 ressuspenso 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 Rastreamento de mutações primárias

#### 3.2.2.1. Mutação G11778A no gene *MT-ND4*

Foi amplificada, de cada paciente, a região do DNA mitocondrial que contém o nucleotídeo da posição 11778. Os *primers* para a amplificação desta região, de 49pb são descritos na tabela 3.

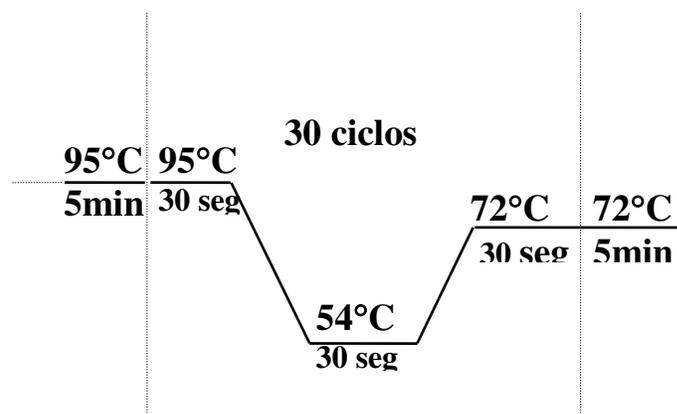
**Tabela 3** – Sequência de *primers* para a amplificação da região 11778 do gene *MT-ND4*.

Nome	<i>Primers (5'→3')</i>	Tamanho
G11778Aa	AAC TAC GAA CGC ACT CAC AG	20pb
G11778Ab	GAA GTC CTT GAG AGA GGA	18pb

A reação de amplificação foi realizada usando 1µL de DNA genômico, 5µL de solução contendo desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2µL de cada *primer* (direto e inverso) na concentração de 0,1µg/µL; 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL); 5µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), em um volume final de 50µl.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler – Applied Biosystems). Foram então realizados repetidos ciclos de aquecimento a 95° 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 na Figura 11 (Zeviani et al. 1991; Santorelli et al.1997).



**Figura 11** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11778A.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% posteriormente corado com brometo de etídeo. O gel é constituído de 100mL de tampão TBE (Tris, Ác. Bórico, EDTA). Misturaram-se 10,0 µl das amostras amplificadas a 2,0 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%). Foram utilizados marcadores de peso molecular (DNA *Ladder*) de 10pb. A corrida eletroforética ocorreu a 120V por aproximadamente 30 min. O gel foi então levado ao transiluminador com lâmpada ultravioleta para visualização e análise.

O produto amplificado de 49pb foi digerido com a enzima de restrição *Sfa*N I , a 39°C por 2 horas, da seguinte forma:

17,5µL de produto de PCR

2,0µL de tampão da enzima

0,5µL da enzima *Sfa*N I (5000U/µl)

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3,0% em tampão TBE 1X. A seqüência normal apresenta um sítio de restrição, gerando fragmentos de 17 e 32pb, ao passo que na mutante é perdido um sítio de *Sfa*N I

apresentando um fragmento de 49pb. O gel foi corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5g/mL e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta.

### 3.2.2.2. Mutação T14484C no gene *MT-ND6*

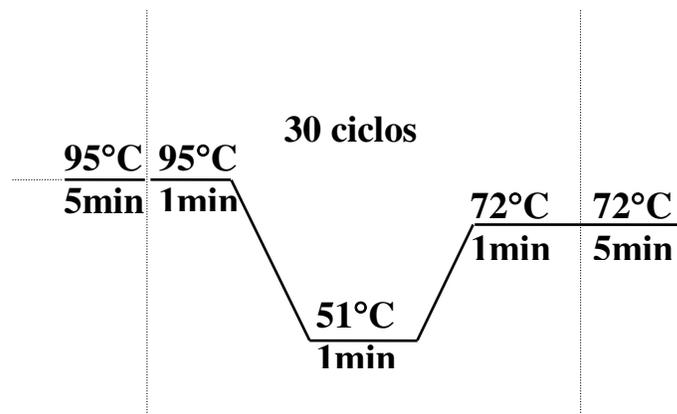
A região do mtDNA contendo o nucleotídeo da posição 14484 foi amplificada. Os *primers* para a amplificação desta região, de 154pb são descritos na Tabela 4.

**Tabela 4** – Sequência de *primers* para a amplificação da região 11778 do gene *MT-ND4*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
T14484Ca	GTA GTA TAT CCA AAG ATA ACC A	22pb
T14484Cb	CTT CTA AGC CTT CTC CTA	18pb

A reação de amplificação foi realizada usando 1µL de DNA genômico, 5µL de solução contendo desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2µL de cada *primer* (direto e inverso) na concentração de 0,1µg/µL; 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL); 5µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), em um volume final de 50µL.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler – Applied Biosystems). 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 na Figura 12



**Figura 12** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T14484A

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% posteriormente corado com brometo de etídeo. O gel é constituído de 100mL de tampão TBE (Tris, Ác. Bórico, EDTA). Misturaram-se 10,0 µl das amostras amplificadas a 2,0 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%). Foram utilizados marcadores de peso molecular (DNA *Ladder*) de 100pb. A corrida eletroforética foi a 120V por aproximadamente 30 min. O gel foi então levado ao transiluminador com lâmpada ultravioleta para visualização e análise.

O produto amplificado de 154pb foi, então, digerido com a enzima de restrição *BsaB* I, a 39°C por 2 horas, da seguinte forma:

17,5µL de produto de PCR

2,0µL de tampão da enzima

0,5µL da enzima *BsaB* I (5000U/µl)

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3,0% em tampão TBE 1X. A seqüência normal apresenta as bandas dos fragmentos de 19 e 135pb, ao passo que na mutante perde-se um sítio de *BsaB* I apresentando um fragmento de 154pb. O gel foi corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5g/mL e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta.

### 3.2.2.3. Mutação G3460A no gene *MT-ND1*

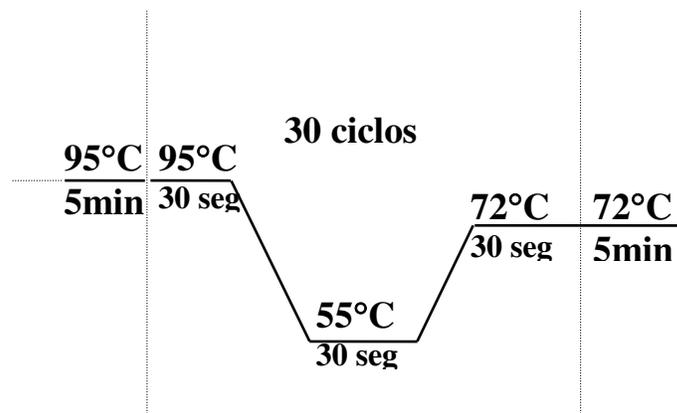
A região do DNA mitocondrial que contém o nucleotídeo da posição 3460 foi amplificada. Os *primers* para a amplificação desta região, de 49pb são descritos na tabela 5.

**Tabela 5** – Seqüência de *primers* para a amplificação da região 3460 do gene *MT-ND1*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
G3460Aa	GGC TAC TAC AAC CCT TCG C	19pb
G3460Ab	GGC TCT TTG GTG AAG	15pb

A reação de amplificação foi realizada usando 1µL de DNA genômico, 5µL de solução contendo desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2µL de cada *primer* (direto e inverso) na concentração de 0,1µg/µL; 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL); 5µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8) e 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), em um volume final de 50µl.

As reações foram realizadas em aparelho termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler – Applied Biosystems). Foram então realizados repetidos ciclos de aquecimento a 95° 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 na Figura 13:



**Figura 13** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G3460A.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% posteriormente corado com brometo de etídeo. O gel é constituído de 100mL de tampão TBE (Tris, Ác. Bórico, EDTA). Misturaram-se 10,0 µl das amostras amplificadas a 2,0 µl de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%). Foram utilizados marcadores de peso molecular (DNA *Ladder*) de 10pb. A corrida eletroforética foi a 120V por aproximadamente 30 min. O gel foi então levado ao transiluminador com lâmpada ultravioleta para visualização e análise.

O produto amplificado de 49pb foi digerido com a enzima de restrição *BsaH I*, a 39°C por 2 horas, da seguinte forma:

17,5µL de produto de PCR

2,0µL de tampão da enzima

0,5µL da enzima *BsaH I* (5000U/µl)

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3,0% em tampão TBE 1X. A seqüência normal apresenta as bandas dos fragmentos de 22 e 27pb,

ao passo que na mutante perde-se um sítio de *Bsa*H I apresentando um fragmento de 49pb. O gel foi corado com brometo de etídio na concentração final de 0,5g/mL e os fragmentos amplificados foram visualizados sob iluminação ultravioleta.

### 3.2.3 Rastreamento das mutações secundárias

As regiões onde são descritas as mutações dos genes foram amplificadas para todos os pacientes que não apresentaram nenhuma mutação primária. O seqüenciamento automático foi usado para rastrear as mutações.

#### 3.2.3.1. Amplificação das regiões de interesse

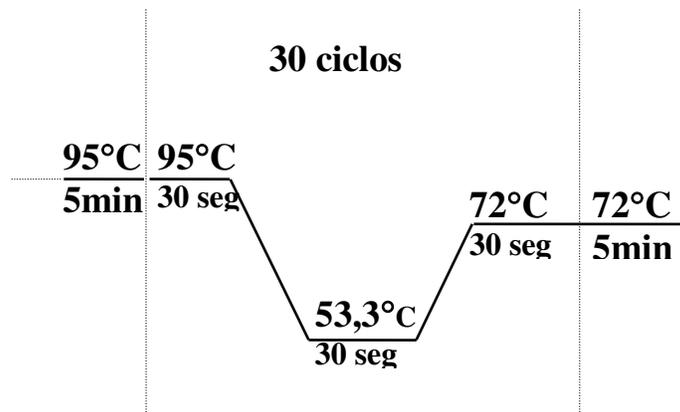
O método de amplificação da região de interesse é semelhante ao usado para rastreamento das mutações primárias, mudando apenas os primers e as temperaturas dos ciclos.

#### 3.2.3.2. Gene *MT-ND1* - mutações T4160C e C4171A

Os *primers* para a amplificação desta região são descritos na tabela 6 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 14.

**Tabela 6** – Seqüência de *primers* para a amplificação da região em que foram rastreadas as mutações T4160C e C4171A no gene *MT-ND1*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
ND1b-F	GAC CCT ACT TCT AAC CTC CC	20pb
ND1b-R	GAT TGT AAT GGG TAT GGA GAC	21pb



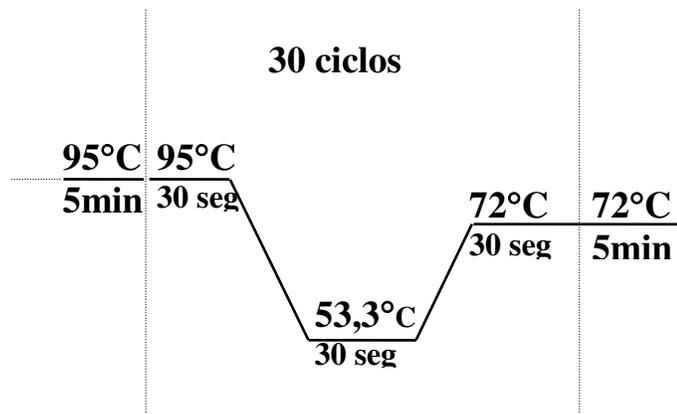
**Figura 14** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações T4160C e C4171A.

### 3.2.3.3. Gene *MT-ND4* - mutações T11253C e G11696A

Dois pares de *primers* para a amplificação de duas regiões distintas nesse gene. O primeiro par de *primers* foi usado para o rastreamento da mutação T11253C, representado na tabela 7 e o seu respectivo ciclo na figura 15.

**Tabela 7** – Seqüência de *primers* para a amplificação da região em que foi investigada a mutação T11253C no gene *MT-ND4*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
ND4a-F	CGC AGG CAC ATA CTT CC	17pb
ND4b-R	GAT AGT TCT TGG GCA GTG AG	20pb

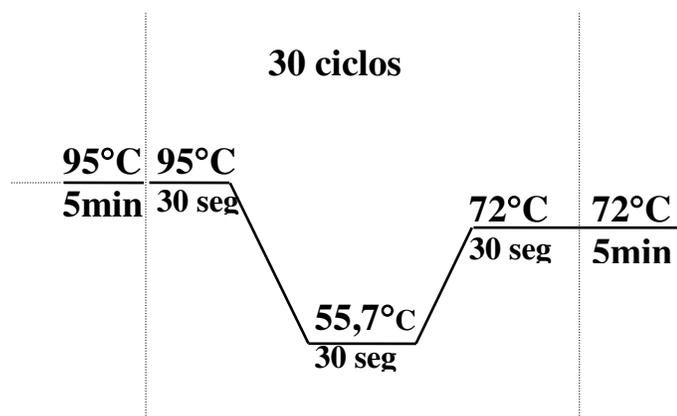


**Figura 15** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T11253C.

O segundo par de *primers* foi feito para rastrear a mutação G11696A. Esses primers e o seu ciclo estão representados, respectivamente, na tabela 8 e na figura 16.

**Tabela 8** – Sequência de *primers* para a amplificação da região em que foi investigada a mutação G11696A no gene *MT-ND4*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
ND4b-F	CTC TTC AAT CAG CCA CAT AGC	21pb
ND4b-R	CAT CAA AAA GCT ATT AGT GGG	21pb



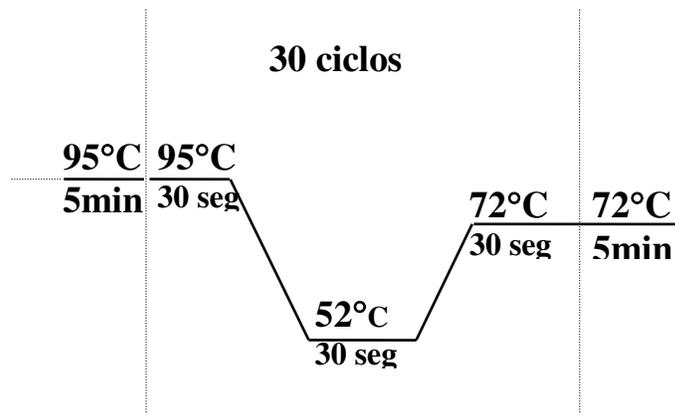
**Figura 16** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11696A.

### 3.2.3.4. Gene *MT-ND4L* - mutação T10663C

Os *primers* para a amplificação desta região são descritos na tabela 9 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 17.

**Tabela 9** – Sequência de *primers* para a amplificação da região em que foi investigada a presença da mutação T10663C no gene *MT-ND4L*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
ND4L-F	GCT ACT CTC ATA ACC CTC AAC	21pb
ND4L-R	GCA TTG GAG TAG GTT TAG G	19pb



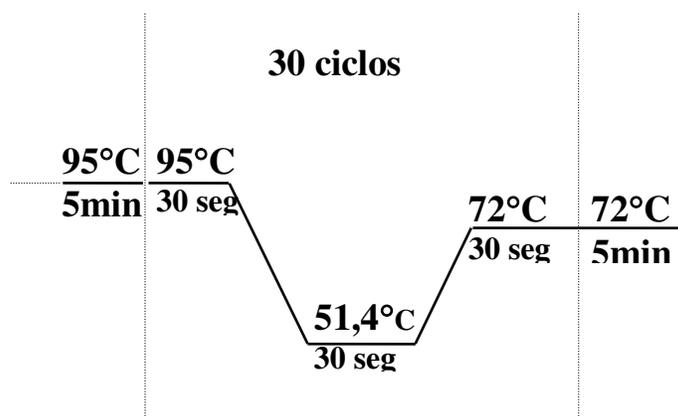
**Figura 17** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T10663C.

### 3.2.3.5. Gene *MT-ND5* - Mutações A13637G e G13730A

Os *primers* para a amplificação desta região são descritos na tabela 10 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 18.

**Tabela 10** – Sequência de *primers* para a amplificação da região em que foram rastreadas as mutações A13637G e G13730A no gene *MT-ND5*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
ND5-F	GTC AAC CTC GCT TCC C	16pb
ND5-R	GAG TTT TAG GTA GAG GGG G	19pb



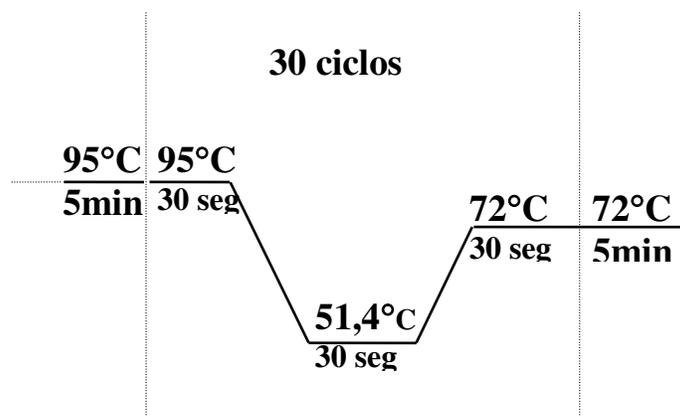
**Figura 18** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações A13637G e G13730A.

### 3.2.3.6. Gene *MT-ND6* - Mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A

Os *primers* para a amplificação desta região são descritos na tabela 11 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 19.

**Tabela 11** – Sequência de *primers* para a amplificação da região que foram rastreadas as mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A no gene *MT-ND6*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
ND6-F	CAC CAA GAC CTC AAC CC	17pb
ND6-R	GTA TGC TTT GTT TCT GTT GAG	21pb



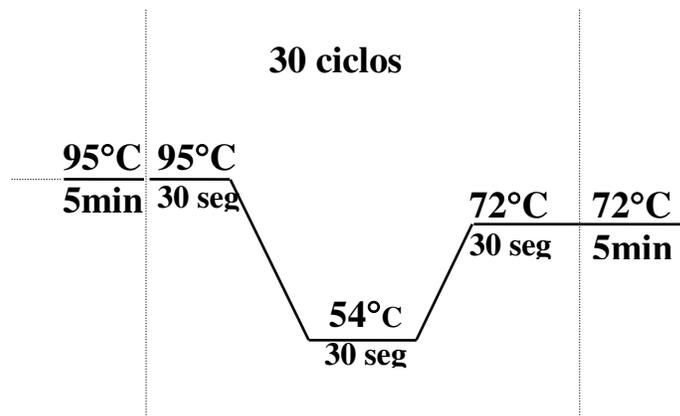
**Figura 19** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo das mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e G14596A.

### 3.2.3.7. Gene *MT-CYB* - Mutação G15257A

Os *primers* para a amplificação desta região são descritos na tabela 12 e os ciclos com suas respectivas temperaturas na figura 20.

**Tabela 12** – Sequência de *primers* para a amplificação da região em que foi rastreada a mutação G15257A no gene *MT-CYB*.

Nome	<i>Primers</i> (5'→3')	Tamanho
NDCYB-F	CTT ACT ATC CGC CAT CCC	18pb
NDCYB-R	GGG CAA GAT GAA GTG AAA G	19pb



**Figura 20** - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G15257A.

### 3.2.4. Seqüenciamento automático

#### 3.2.4.1. 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 seqüenciamento.

#### 3.2.4.2 Reação de seqüenciamento automático para produto de PCR

As reações de seqüenciamento foram realizadas no seqüenciador 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:

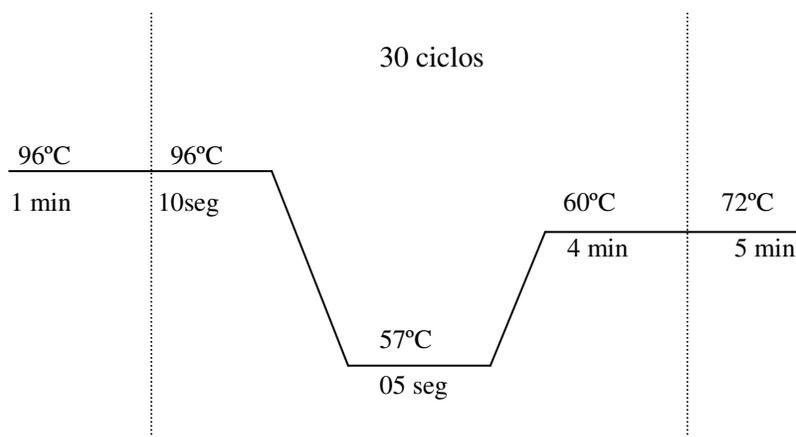
40-80ng de DNA

2µL do *mix BigDye*

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

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

A reação de seqüenciamento consistiu de 30 ciclos nas condições especificadas na Figura 21.



**Figura 21** – Ciclos utilizados no seqüenciamento.

As reações de seqüenciamento 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

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 seqüenciador, as seguintes etapas foram seguidas:

- foram adicionados 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 seqüenciador

### **3.2.4.3 Análise das seqüências obtidas**

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com a seqüência normal com o auxílio dos softwares *Chromas Lite 2.01* e *CLC Sequence Viewer 6.0.1*.

### **3.3 Rastreamento de mutações primárias por DHPLC (cromatografia líquida desnaturante de alta performance)**

Pacientes que foram previamente rastreados, pelo método enzimático, para verificar a presença de mutações primárias, e por seqüenciamento, para certificar que não tinham nenhuma alteração nos genes, foram usados como controles positivos e negativos, respectivamente.

Foram amplificadas pela técnica de PCR as regiões de interesse desses controles e seus produtos foram usados para a padronização do método de cromatografia líquida desnaturante de alta performance (DHPLC):

A triagem foi realizada por cromatografia líquida desnaturante de alta performance que está baseada no pareamento de íons em fase reversa sob condições desnaturantes usando como princípio: 1- formação de heteroduplexes através da hibridação após o aquecimento e esfriamento dos produtos da PCR; 2- separação dos heteroduplexes e homoduplexes sob condições parciais de desnaturação.

A análise foi realizada em um sistema DNA WAVE 4500A (Transgenomic, Santa Clara, CA) como descrito a seguir: a PCR para cada amplicon foi realizada em volume final de 20µL contendo 5µM de cada primer específico ( os mesmos usados para o sequenciamento), 200µM de cada dNTP, 0,5U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 50ng de DNA. A qualidade do produto da PCR foi observada em gel de agarose antes da análise por DHPLC. Os produtos de PCR foram então desnaturados a

95°C por 5 minutos seguidos por re-anelamento gradual em temperatura ambiente durante 45 minutos, permitindo a formação de heteroduplexes dos produtos de PCR.

Após essa etapa, 5 µL dos produtos foram colocados em coluna DNASep® com taxa e fluxo de 0.9mL/min e com temperaturas adequadas para cada fragmento de PCR de acordo com as recomendações do programa Wavemaker™. A composição dos tampões usados foi: Tampão A – 0.1M acetato trietilamonio (TEAA) e Tampão B - 0.1M 25% acetonitrila em TEAA. Ao final do processo foram comprados os perfis cromatográficos dos controles normais e mutantes para cada mutação através de inspeção visual.

# **RESULTADOS**

---

## 4. Resultados

O resumo dos resultados obtidos no rastreamento das mutações primárias e mutações secundárias estão resumidos na tabela 15 presente nas páginas 110 e 111.

### 4.1 Rastreamento das Mutações Primárias

Foram estudados 55 pacientes (casos-índice) para verificar a presença e a frequência das mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A. A tabela 13 apresenta o resumo dos resultados obtidos para o rastreamento das mutações primárias:

**Tabela 13** – Resumo dos resultados encontrados para o rastreamento das mutações primárias.

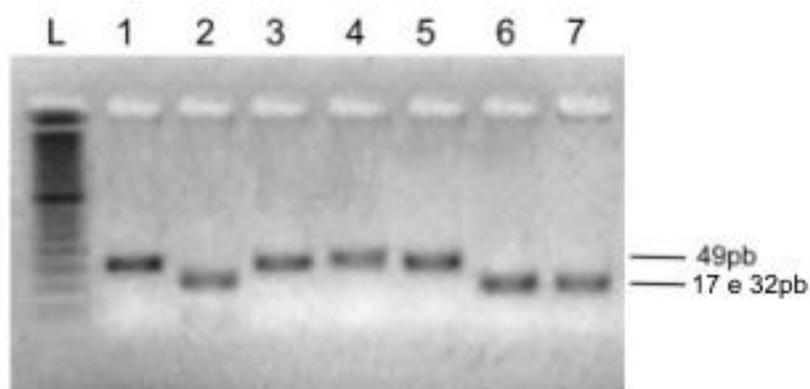
Mutação	Número de casos-índice	Frequencia
<b>G11778A</b>	13	23,5
<b>T14484C</b>	5	9,5
<b>G3460A</b>	1	2
<b>Sem mutação *</b>	36	65

\*Pacientes nos quais não foram encontradas as mutações primárias

#### 4.1.1 Mutação G11778A no gene *MT-ND4*

Dos 55 pacientes estudados, 13 deles apresentaram a mutação G11778A. A análise dessa mutação foi realizada por análise de restrição. Após a amplificação da região do DNA mitocondrial que contém o nucleotídeo na posição 11778, os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *SfaN I*.

Em 42 indivíduos, dos 55 analisados, houve a clivagem dos fragmentos amplificados, gerando fragmentos de 17 e 32pb, o que significou que a seqüência era normal. Porém, nos 13 indivíduos restantes o sítio de *Sfa*N I foi abolido e os fragmentos continuaram com 49pb, o que evidencia a presença da mutação nessa região. No gel de agarose os fragmentos de 17 e 32pb se deslocaram quase juntos, deixando a impressão da formação de apenas uma banda. A figura 22 exemplifica o padrão de bandas para os resultados positivos e negativos para a mutação G11778A.



**Figura 22** - Padrão de bandas para a mutação G11778A em gel de agarose 3%. (L) *Ladder* 10 pb Invitrogen®. (1) Controle mutante. (2) Controle sem mutação. (3)-(5) indivíduos mutantes. (6), (7) indivíduos sem a mutação.

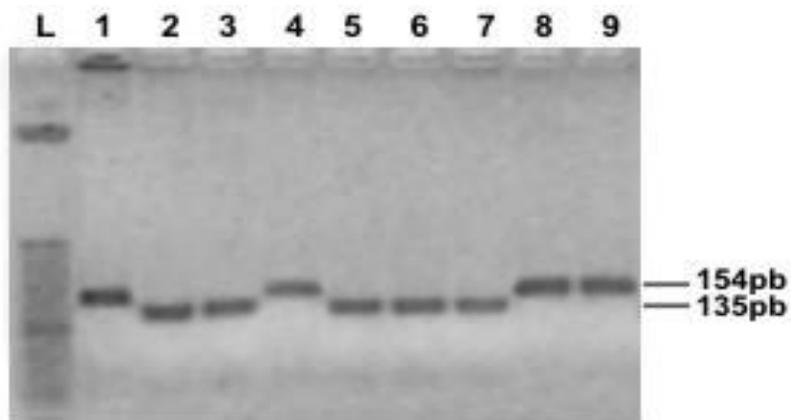
#### 4.1.2 Mutação T14484C no gene *MT-ND6*

A mutação T14484C no gene *MT-ND6* foi encontrada em 5 pacientes dos 55 estudados. O diagnóstico também foi realizado por análise de restrição, seguido da amplificação da região do mtDNA que possuía o nucleotídeo na posição 14484. Após amplificados, os fragmentos foram submetidos à digestão com enzima de restrição *Bsa*B I.

Foram observados em gel de agarose fragmentos de 154pb nos indivíduos mutantes e 135pb nos pacientes normais. Foi explicado anteriormente que a clivagem da enzima *Bsa*B I gerava fragmentos de 135pb e fragmentos de apenas 19 pb. Esses últimos fragmentos não ficaram visíveis em gel de agarose, por isso o resultado final do

rastreamento da mutação foi determinado analisando apenas os fragmentos de 135pb e 154pb.

A figura 23 exemplifica a distribuição dos padrões de banda mutantes e normais no rastreamento da mutação T14484C no *MT-ND6* em gel de agarose:



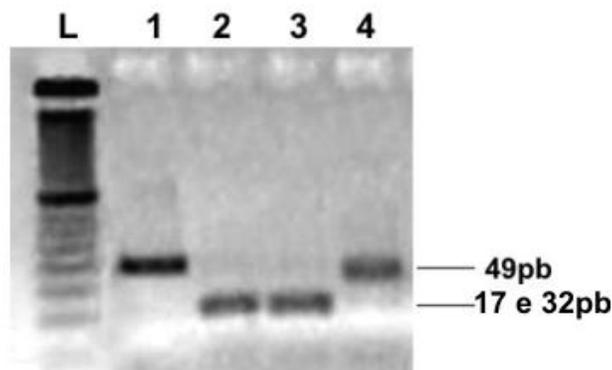
**Figura 23** – Padrão de bandas para a mutação T14484C em gel de agarose 3%: (L) *Ladder* 1kb *plus* Invitrogen®; (1) Controle mutante; (2) controle normal; (3), (5), (6) e (7) pacientes sem mutação; (4), (8) e (9) pacientes com a mutação.

#### 4.1.3 Mutação G3460A no gene *MT-ND1*

Dos 55 pacientes estudados apenas 1 deles apresentou a mutação G3460A gene *MT-ND1*. A detecção dessa mutação foi à última a ser realizada, e também passou por todos os passos das mutações citadas acima, ou seja, análise de restrição, amplificação da região do mtDNA de interesse e digestão com a enzima *BsaH I*.

Assim como na mutação G11778A, os fragmentos produzidos após a restrição enzimática para a detecção da mutação G3460A eram de 17 e 32pb quando o paciente era normal. O paciente mutante apresentou fragmentos de 49pb.

A figura 24 exemplifica os padrões de banda mutantes e normais no rastreamento da mutação G3460A no *MT-ND1* em gel de agarose:



**Figura 24** – Padrão de bandas para a mutação G3460A em gel de agarose 3%. (L) *Ladder* 10pb Invitrogen®. (1) paciente sem digerir (controle positivo); (2) Controle negativo; (3) Paciente sem mutação; (4) paciente com mutação.

#### 4.2 Rastreamento de Mutações Secundárias

Dos 55 pacientes rastreados para a detecção de mutações primárias, 36 deles não apresentaram as respectivas mutações. Esses indivíduos tiveram seus fragmentos de interesse amplificados e posteriormente submetidos ao seqüenciamento direto para detecção das 14 mutações secundárias distribuídas nos genes *MT-ND1*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6* e *MT-CYB*. E os resultados foram os seguintes: No gene *MT-ND1* foram rastreadas as mutações T4160C e C4171A, porém nenhuma das mutações foi encontrada nos 36 pacientes analisados; fato parecido aconteceu nos fragmentos seqüenciados e analisados do gene *MT-ND4*, pois também não foram encontradas as mutações T11253C e G11696A; a mutação T10663C no gene *MT-ND4L* também não foi encontrada em nenhum dos fragmentos analisados; o mesmo ocorreu com as mutações A13637G e G13730A do gene *MT-ND5*; no gene onde a maioria das mutações secundárias está localizada, as mutações G14459A, C14482G, A14495G, T14898C, C14568T e

G14596A , o gene *MT-ND6*, também não foi encontrada nenhuma das mutações de interesse rastreadas nessa região; e por fim, seguindo o que aconteceu com as demais mutações secundárias, o gene *MT-CYB* também não apresentou resultados negativos para a mutação secundária G15257A.

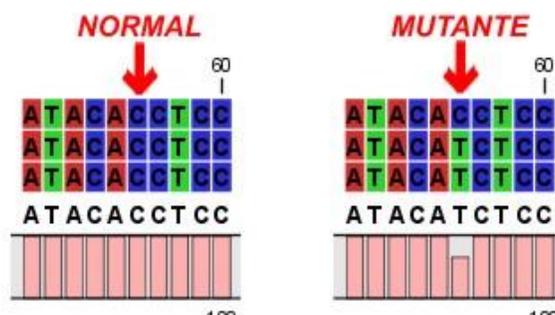
### 4.3 Outras alterações encontradas

Apesar de não terem sido encontradas mutações secundárias nos genes citados acima, foram observadas alterações nos genes *MT-ND1*, *MT-ND4* e *MT-ND6*.

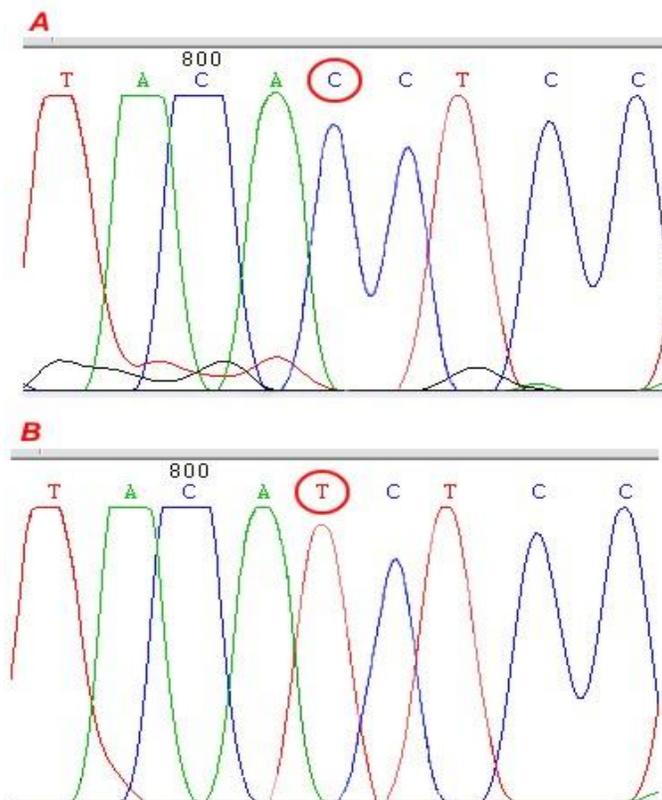
#### 4.3.1 Alteração C4167T no gene *MT-ND1*

A alteração C4167T foi observada no gene *MT-ND1* em estado de homoplasma. A alteração foi encontrada em apenas um dos pacientes e foi considerada uma mutação silenciosa, pois não houve troca de aminoácido.

O resultado do seqüenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 25 e figura 26:



**Figura 25** – Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base C no paciente normal para a base T no paciente que apresentou a alteração C4167T.

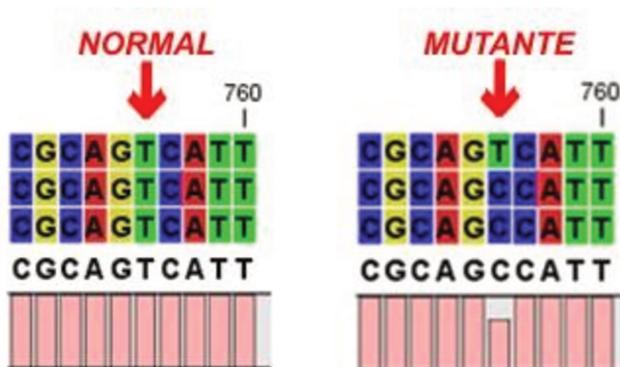


**Figura 26** - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

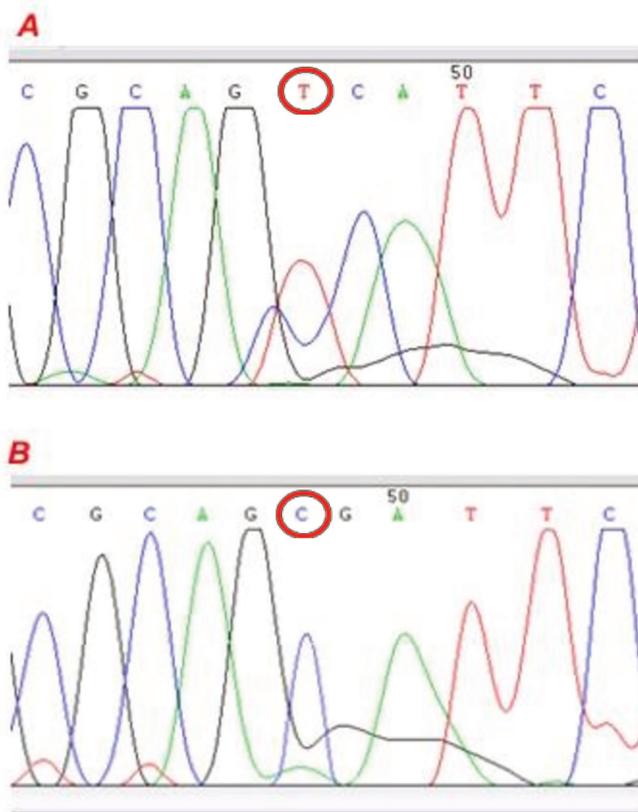
#### 4.3.2 Alteração T11697C no gene *MT-ND4*

A alteração T11697C no gene *MT-ND4* foi observada em estado de homoplasmia. Essa mudança de uma timina para uma citosina na posição 11697 foi encontrada em apenas um dos pacientes e foi considerada uma mutação silenciosa, pois não efetuou troca de aminoácido.

O resultado do seqüenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 27 e figura 28:



**Figura 27** – Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base T no paciente normal para a base C no paciente que apresentou a alteração T11697C.

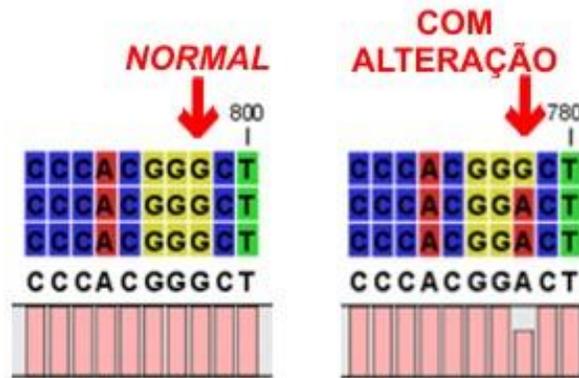


**Figura 28** - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração T11697C. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

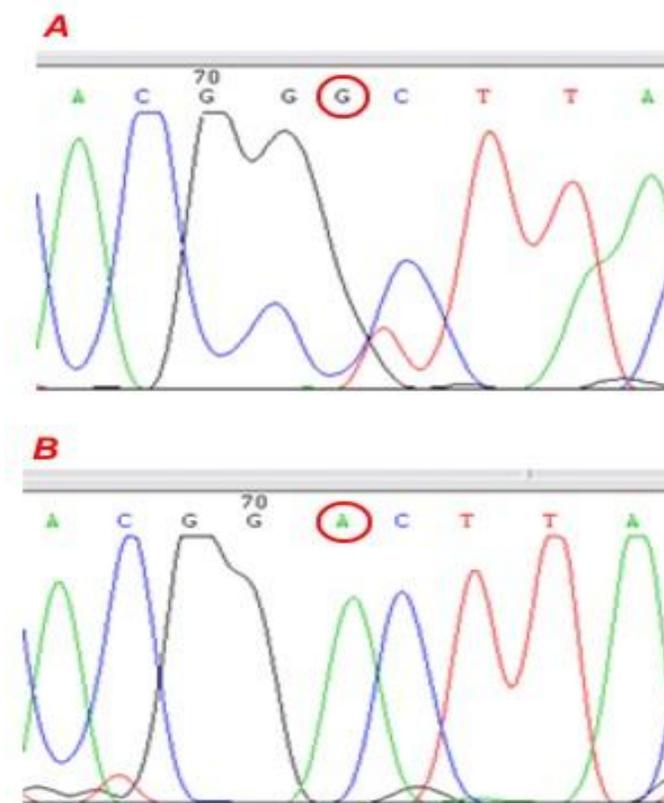
#### 4.3.3 Alteração G11719A no gene *MT-ND4*

Foi encontrada a alteração G11719A no gene *MT-NDI* em estado de homoplasma. A alteração foi observada em 29 pacientes, porém foi considerado um polimorfismo segundo dados da literatura (explicado na discussão).

O resultado do seqüenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 29 e figura 30:



**Figura 29** – Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base G no paciente normal para a base A no paciente que apresentou a alteração G11719A.

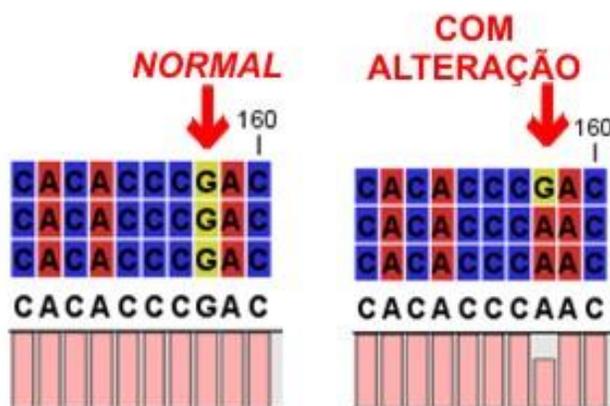


**Figura 30** - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

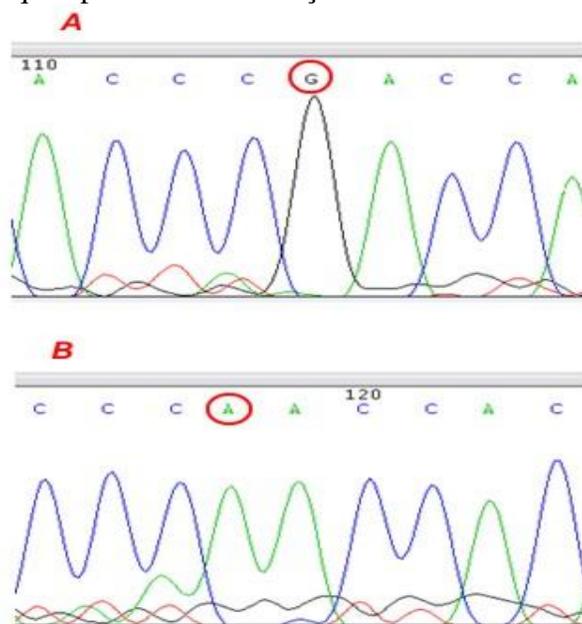
#### 4.3.4 Alteração G14560A no gene *MT-ND6*

Foi observada a alteração G14560A no gene *MT-ND6* em estado de homoplasmia. A alteração foi encontrada em apenas 2 pacientes. Segundo os dados da literatura, essa alteração foi considerada um polimorfismo, e será melhor detalhada na discussão.

O resultado do seqüenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer 6.0.1*, conforme ilustrado na figura 31 e figura 32:



**Figura 31** – Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base G no paciente normal para a base A no paciente que apresentou a alteração G14560A.



**Figura 32** - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

Na tabela 14 um resumo dos resultados obtidos para o rastreamento das mutações secundárias e das alterações encontradas nos fragmentos dos genes estudados:

**Tabela 14** - Mutações secundárias e outras alterações encontradas nos fragmentos dos genes estudados.

<b>Gene</b>	<b>Mutações secundárias</b>	<b>Outras alterações</b>
<i>MT-ND1</i>	N	C4167T*
<i>MT-ND4</i>	N	G11719A*
		T11697C**
<i>MT-ND4L</i>	N	N
<i>MT-ND5</i>	N	N
<i>MT-ND6</i>	N	G14560A*
<i>MT-CYB</i>	N	N

N - Não foram observadas alterações

\* - Polimorfismo

\*\* - Mutação silenciosa



33	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
34	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
35	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
36	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
37	-	NO	M	N	N	NR													
38	-	NO	N	M	N	NR													
39	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
40	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
41	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
42	-	LHON	N	M	N	NR													
43	-	LHON	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
44	-	LHON	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
45	-	NO	M	N	N	NR													
46	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
47	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
48	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
49	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
50	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
51	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
52	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
53	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
54	-	NO	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
55	-	NO	M	N	N	NR													

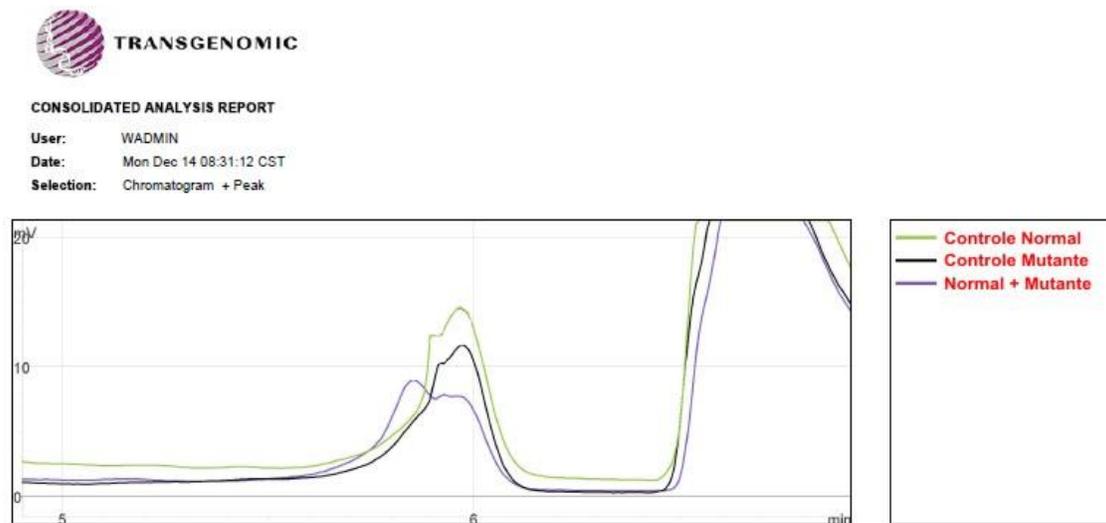
LHON = hipótese diagnóstica de LHON; NO = neuropatia óptica adquirida de origem desconhecida; N = normal para respectiva mutação; **M** = mutante para respectiva mutação; NR = não realizado (portador de mutação primária); - Indivíduo sem parentes no presente estudo.

#### 4.4 Padronização da técnica de DHPLC para a indicação de mutações primárias:

A técnica de DHPLC foi padronizada com sucesso para o rastreamento das mutações primárias. A seguir os resultados para as mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A.

##### 4.4.1 Mutação G11778A

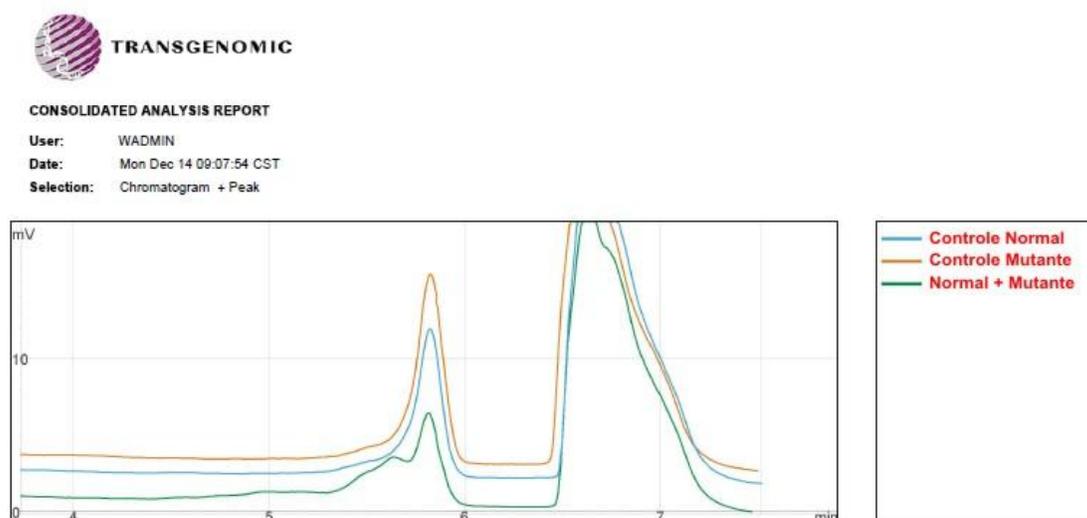
A figura 33 mostra três padrões de corrida, sendo dois semelhantes e um diferente. Os padrões de corrida semelhantes são do controle normal e do controle mutante. Eles apresentaram padrões semelhantes por estarem em estado de homoplasmia. O terceiro padrão de corrida mostrou-se alterado em relação aos outros dois. Esse padrão foi a mistura do controle normal com o controle mutante após a amplificação por PCR e antes da desnaturação por 5 minutos. Essa mistura aconteceu para detectar alterações em homoplasmia, pois quando são renaturados lentamente os dois controles, um contendo o fragmento normal e o outro possuindo o fragmento mutante, tendem a formar heteroduplex.



**Figura 33** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida dos controles normal e mutante, separados e misturados, da mutação G11778A na temperatura de 56,6°C.

#### 4.4.2 Mutação T14484C

Assim como no rastreamento da mutação G11778A, a mutação T14484C estava em homoplasmia e a estratégia utilizada foi a mesma. Foram também obtidos três padrões de corrida, sendo dois semelhantes e um diferente. Os controles normal e mutante apresentaram padrão semelhante e a mistura normal e mutante apresentou um padrão diferente. O resultado está ilustrado na figura 34.

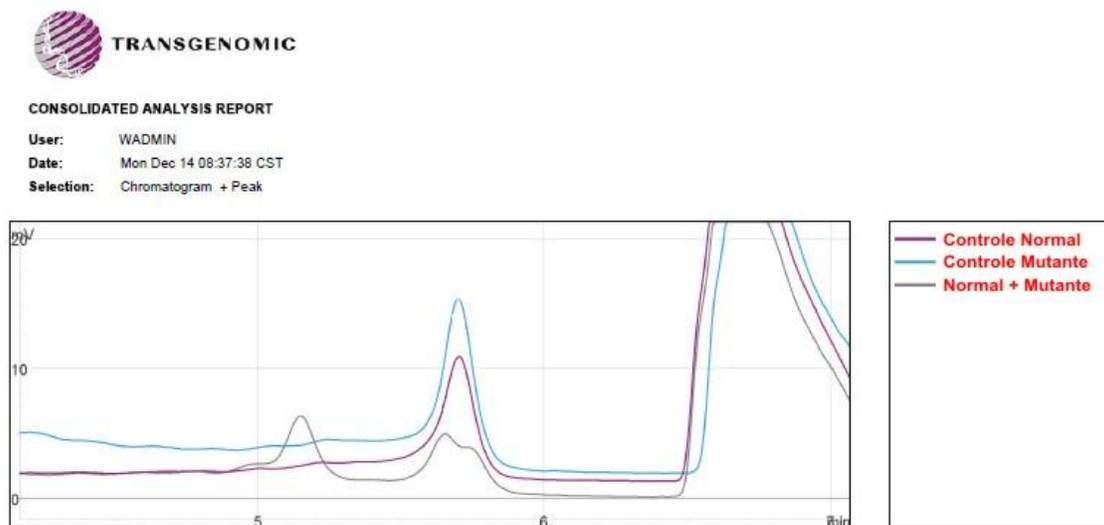


**Figura 34** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida dos controles normal e mutante, separados e misturados, da mutação T14484C na temperatura de 55,1°C.

#### 4.4.3 Mutação G3460A

Assim como no rastreamento das outras mutações primárias, a mutação G3460A estava em homoplasmia e a estratégia utilizada foi idêntica. Foram também obtidos três padrões de corrida (também um diferente e dois iguais). Os controles normal e mutante apresentaram

padrão semelhante e a mistura normal e mutante apresentou um padrão diferente. O resultado está exposto ilustrativamente na figura 35.



**Figura 35** – Resultado da cromatografia obtida pela técnica de DHPLC na corrida dos controles normal e mutante, separados e misturados, da mutação G3460 na temperatura de 63,3°C.

## **DISCUSSÃO**

---

## 5. DISCUSSÃO

A Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON), apesar de ser descrita pela primeira vez em 1871, só passou a ser mais estudada quase 100 anos depois, por volta de anos 80. Essa doença mitocondrial teve maior detalhamento na última década com maior número de pesquisas realizadas. Por isso, muitas informações, ainda estão incompletas e muitas questões continuam obscuras. Exemplo disso é o fato de até o presente momento não estar bem elucidado como as mutações influenciam no funcionamento do DNA mitocondrial e nem como essas alterações agem nas células do nervo óptico. Outro fator que comprova que perguntas ainda precisam ser respondidas é o número de mutações encontradas. No ano de 2009 foram descritas 21 mutações mitocondriais responsáveis pela LHON, mas esse número gera controvérsias entre autores, que consideram 17 mutações de fato causadoras da LHON. O que todos concordam é que existem 3 das mutações principais descritas, chamadas primárias, sendo as mutações restantes denominadas secundárias. As mutações chamadas primárias acontecem em 95% dos casos e as secundárias em apenas 5% (Yu-Wai-Man et al., 2009). Não há na literatura pesquisas sobre frequências das mutações em todas as populações mundiais, e isso inclui o Brasil, o que dificulta reunir dados que possam ajudar na definição de como lidar com ela. Por esse motivo o presente estudo teve como principal objetivo definir a frequência das mutações relacionadas à LHON em pacientes brasileiros.

Em indivíduos afetados por LHON a proporção de mitocôndrias com a mutação presentes em células do sangue periférico pode ser a mesma das encontradas no nervo óptico (Mroczek-Tonska et al., 2003). Entretanto, existe a possibilidade de que nesses casos os níveis de mutações em linfócitos e nas células do nervo óptico possam ser diferentes. Neste estudo, o diagnóstico molecular foi baseado em testes utilizando sangue extraído de DNA de mitocôndrias presentes no sangue periférico. Há portanto, a possibilidade da obtenção de resultados divergentes. A maioria das mutações estudadas possivelmente estão em homoplásmia. Dados na literatura mostram que as mutações

primárias em geral, de fato, se encontram em homoplasmia (Mroczek-Tonska et al., 2002; Man et al., 2003; Yu-Wai-Man et al., 2009).

Foram estudados 55 pacientes para verificar a presença e a frequência das mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A. Como resultado, foi diagnosticado a presença de 19 pacientes portadores de alguma das mutações primárias. Desses 19 indivíduos, 13 deles apresentaram a mutação G11778A, 5 deles a mutação T14484C e apenas 1 deles com a mutação G3460A. Esses dados confirmam a maior incidência da mutação G11778A (maior causa da LHON na maioria das populações estudadas), seguida da mutação T14484C e da mutação G3460A, assim como na maioria das populações estudadas em todo o mundo.

A frequência de mutações primárias observada foi de 67,5% para a mutação G11778A, 26,5% para a mutação T14484C e 5% para a mutação G3460A. No entanto, dados da literatura internacional mostram que a frequência média é de 69% da mutação G11778A, 14% da mutação T14484C e 13% da mutação G3460A (Man e Chinnery, 2008). A diferença na frequência das mutações primárias gera algumas hipóteses, mas o fato de o Brasil apresentar origem étnica bastante heterogênea pode ser responsável pela população ter características de mutações mitocondriais distintas em relação à outras populações.

Analisando os dados citados acima, a mutação G11778A apresentou uma frequência bem próxima ao esperado nas populações estudadas. Além de apresentar dados próximos aos da média mundial, a frequência encontrada no presente estudo também se assemelha aos dados registrados na Finlândia (69%). Porém diferenças foram encontradas quando a frequência foi comparada com outras populações em específico: 50% dos casos na Europa, 69% na Finlândia e quase 95% na população asiática (Wallace e Lott, 1993; Newman et al., 1993; Huoponen, 2001; Yu-Wai-Man et al., 2009).

A mutação T11778C foi encontrada em aproximadamente 26,5% dos indivíduos estudados, essa frequência é próxima do dobro da encontrada especificamente na Finlândia e na média das demais populações estudadas (14%). Fato curioso é que essa mutação é

encontrada com frequência muito baixa nas populações orientais e em um estudo no nordeste da Inglaterra, mas é considerada a mutação mais freqüente entre canadenses descendentes de franceses. Esse fato é atribuído a um possível efeito fundador. Portanto, um efeito fundador que pudesse ocorrer em populações dentro do Brasil seria mais que suficiente para alterar as frequências da LHON no país (Macmillan et al. 2000; Yu-Wai-Man et al., 2009).

O resultado que mais causou surpresa foi o da mutação G3460A, pois se esperava que essa mutação seguisse a frequência da mutação T14484C, já que em diversas partes do mundo elas têm frequências relativamente próximas. Entretanto, nos pacientes analisados a mutação foi encontrada apenas uma vez. O fato de essa mutação ter aparecido apenas em um paciente, quando se esperava uma frequência maior, não exclui a possibilidade de que a frequência venha a ser normal na população brasileira. A baixa frequência se deve talvez ao número baixo de casos estudados.

O rastreamento das mutações secundárias não obteve resultado positivo, ou seja, não foi encontrada nenhuma das 14 mutações procuradas e nem nenhuma outra mutação referente à LHON que coincidentemente estivesse em algum dos fragmentos seqüenciados. Se considerar que as mutações secundárias aconteceram em 5% dos casos em outros estudos, a estimativa seria de 5 mutações secundárias para em um grupo de 100 portadores da LHON. Reduzindo esse número, daria 1 mutação secundária a cada 18 indivíduos com mutações primárias. Portanto, era esperado que pelo menos uma mutação secundária fosse encontrada no estudo. A explicação para o não aparecimento das mutações secundárias pode ser encontrada no fato de que essas mutações são encontradas muito raramente nas demais populações estudadas (Man e Chinnery, 2008). Exemplo disso são as mutações C4171A e a mutação G14459A descritas por Kim et al e Gropman et al, respectivamente, como muitas raras. As mutações G14596A e A11696G têm apenas 11 casos de cada registrados na literatura, todos em apenas uma família (De Vries et al., 1996). Casos mais raros são as mutações T11253C e G13730A como apenas um caso relatado na literatura (Howell et al., 1998; Leo-Kottler et al., 2002).

Apesar de não serem localizadas mutações secundárias, foram encontradas outras alterações observadas durante a análise dos resultados do seqüenciamento das regiões onde foram rastreadas as mutações secundárias. Duas alterações em estado de homoplasmia foram observadas, a alteração C4167T no gene *MT-ND1* e a alteração T11697C no gene *MT-ND4*, mas logo foram consideradas mutações silenciosas, pois a substituição de suas bases não ocasionou alteração de aminoácido. Em 29 pacientes foi encontrada a alteração G11719A, que em 2004 Saranath e colaboradores observaram em 20/24 pacientes com câncer oral e 20/21 indivíduos normais, mas essa alteração foi considerada um polimorfismo, pois estão presentes em mais de 1% da população. Dois pacientes apresentaram a presença do polimorfismo G14560A, que foi observado em pacientes com câncer de tiróide (Brandon et al., 2006; Chinnery et al., 2001). Embora encontradas em pacientes com suspeita de LHON ou Neuropatia Óptica de origem desconhecida, não houve dados na literatura que relacionasse as alterações encontradas e essas doenças.

Dos 55 pacientes estudados, apenas 19 deles apresentaram mutações primárias e nenhum deles apresentou mutações secundárias. Foram 36 os indivíduos que não apresentaram mutações descritas como causadoras da LHON. Algumas são as hipóteses que puderam ser levantadas para explicar tal fato: a primeira hipótese é a de que os pacientes que não apresentaram resultado molecular positivo para as mutações estudadas estejam em estado de heteroplasmia e carreguem mitocôndrias com baixa taxa de mutações em seu sangue periférico (Chinnery et al. 2001). Outra hipótese seria de os indivíduos serem portadores de mutações em regiões do DNA mitocondrial diferentes das que foram estudadas nesse trabalho, sendo essas mutações já descritas anteriormente como raras ou mutações que ainda não foram descritas. E por fim, também há a possibilidade de os pacientes serem portadores de alguma doença com sintomas clínicos muito semelhantes à LHON.

Se forem analisados os casos estudados levando em consideração os pacientes com suspeita diagnóstica de LHON, teremos o seguinte resultado: Dos 17 casos estudados, 11

deles apresentaram mutações primárias e 6 não apresentaram nenhuma mutação. Os 11 pacientes mutantes tiveram seu diagnóstico clínico confirmado como LHON através dos testes moleculares. Porém os 6 casos em que não foram encontradas as mutações não puderam ser esclarecidos, mas o presente estudo não pode simplesmente afirmar que esses casos não se tratam de LHON, pois o fato de não apresentarem mutações pode ser causado por fatores como heteroplasmia ou mutações em outras regiões não estudadas.

Considerados apenas os 38 indivíduos com Neuropatia Óptica de origem desconhecida (NO) o saldo foi de 8 pacientes com mutação primária. Neste caso o diagnóstico molecular foi útil nos indivíduos com mutação detectada, pois eles deixaram de serem portadores de NO e passaram a ser considerados portadores da LHON. Esse diagnóstico pode ser útil para determinar que pacientes com NO são realmente portadores da LHON, ajudando assim a definir metas de como orientar os pacientes com os quadros esclarecidos a como lidar com a doença. No caso dos 30 pacientes que não apresentaram mutações, não pode ser descartada a hipótese citada nos casos acima, assim como não pode ser ignorado o fato de esses pacientes poderem possuir outra doença com quadro clínico semelhante ao da LHON.

Sabe-se que a LHON é uma doença mitocondrial, e como toda doença que tem origem por disfunção das mitocôndrias, a sua transmissão obedece ao padrão de herança materna. O caso-índice 12 tratava-se de uma filha e uma mãe que apresentavam quadro clínico característico da LHON. Os resultados dos testes moleculares realmente confirmaram a presença da mutação T14484C em ambas as pacientes, evidenciando que provavelmente a mãe transmitiu a doença para a filha. Outro resultado que merece relevância é o caso-índice 4, pois ambas as pacientes, também mãe e filha, apresentaram hipótese diagnóstica de LHON, porém as duas tiveram resultados negativos para as 17 mutações.

O rastreamento de mutações através do método de DHPLC foi padronizado com sucesso para o rastreamento das mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A. A busca das mutações foi baseada na diferença de afinidade dos homoduplexes e

heteroduplexes pela fase sólida da cromatografia em condições parcialmente desnaturantes da amplificação dos fragmentos onde estavam as mutações. No presente estudo foi necessário atentar ao fato de as mutações primárias estarem geralmente em estado homoplásmico. Quando as mutações estão nesse estado o padrão de corrida dos fragmentos mutantes são semelhantes aos padrões normais, pois quando há a renaturação há a formação de homoduplexes nos dois casos. Por isso, a estratégia utilizada foi correr uma amostra com o controle mutante, outra amostra com o controle normal e uma terceira com a mistura das amostras. O resultado obtido foi justamente o esperado: os dois primeiros padrões foram semelhantes, mostrando que os fragmentos eram homoplásmicos e o terceiro com um padrão diferente dos outros, evidenciando ser possível detectar mutações em homoplasmia. Dessa forma a técnica foi validada para a detecção das três mutações primárias, desde que siga a seguinte estratégia: para cada paciente devem ser feitas duas corridas, uma contendo somente o produto de PCR que se quer determinar se há mutação, importante para a detecção se houver heteroplasmia, e a segunda contendo a mistura do produto de PCR do paciente com o produto de um controle normal, para a detecção no caso de homoplasmia. Um fator que deve ser evidenciado é o fato de a técnica não determinar qual mutação foi encontrada, ela apenas alerta para a presença das alterações no fragmento, sendo necessário, nos casos que esse alerta ocorra, o uso de alguma outra técnica mais eficiente em determinar qual a alteração encontrada. A técnica de DHPLC possui sensibilidade e especificidade em valores muito iguais, ou muito próximos, dos 100%. Portanto essa técnica tem sido muito usada para detectar a presença de alterações no DNA com muita segurança e precisão, se comparada a outras técnicas. Além disso, ela não exige nenhum tratamento especial ao produto de PCR a ser analisado, pois possui alto grau de automação. Por esses motivos o uso do método é viável graças à eficiência e o baixo custo no caso de detecção de mutações rotineiras ou de grande escala.

## **CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

1. A mutação G11778A apresenta números relativamente próximos aos encontrados nas demais populações estudadas, confirmando ser a principal causa de LHON também em indivíduos brasileiros;
2. A mutação primária T14484C, como na maioria das populações estudadas, mostrou-se como a segunda maior causa da LHON, mas mostrou uma frequência quase duas vezes maior que o descrito na literatura;
3. A mutação G3460A não se apresentou como o esperado, mostrando uma frequência muito baixa se comparada às outras partes do mundo;
4. As mutações secundárias não foram encontradas nos pacientes estudados. A ausência dessas mutações pode ser atribuída à possibilidade de haver mutações em regiões no DNA mitocondrial não rastreadas no presente estudo;
5. Há também a possibilidade dos pacientes estudados nos quais não foram localizadas mutações não se tratarem de LHON apresentando outra anomalia com dados clínicos semelhantes;
6. O Método de DHPLC mostrou ser confiável, tendo excelente precisão para a detecção das mutações primárias G11778A, T14484C e G3460.

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B, ALEXANDER J, JULIAN L, MARTIN R, KEITH R, PETER W. Molecular Biology of the Cell. New York: **Garland Publishing Inc.** 1994. ISBN 0815332181.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON J. **Biologia Molecular da Célula. 2ª ed.** Porto Alegre, Editora. Artes Médicas, 1997.

AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY. Basic and clinical science course. Section 2. Fundamentals and principles of Ophthalmology. Los Angeles: **Jules Stein Eye Institute;** 1999-2000. p.183-302.

ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, BRUIJN MHL, COULSON AR, DROUIN J, EPERON IC, NIERLICH DP, ROE BA, SANGER F, SCHREIER PH, SMITH AJH, STADEN R, YOUNG IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, 1981;290:457-65.

AUMONT, J. **In:A Imagem.** São Paulo: Ed. Papirus, 1995

BALDO, Marcus Vinícius C; HADDAD, Hamilton. Ilusões: o olho mágico da percepção. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, 2009 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextepid=S1516-44462003000600003&lng=pt&nr=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextepid=S1516-44462003000600003&lng=pt&nr=iso)>. acessos em 30 dez. 2009. doi: 10.1590/S1516-44462003000600003.

BARACCA A, SOLAINI G, SGARBI G, LENZA G, BARUZZI A, SCHAPIRA AH, MARTINUZZI A, CARELLI V. Severe impairment of complex I-driven adenosine triphosphate synthesis in leber hereditary optic neuropathy cybrids. **Arch Neurol.** 2005 May;62(5):730-6.

BATTISTI C, FORMICHI P, CARDAIOLI E, BIANCHI S, MANGIAVACCHI P, TRIPODI SA, TOSI P, FEDERICO A. Cell response to oxidative stress induced apoptosis in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2004 75(12):1731-6.

BEAL, M.F. Aging , energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Ann Neurol** 38:357-66, 1995.

BICAS, H. E. A.. Fisiologia da visão binocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 172-80, 2004.

BIOUSSE V, NEWMAN NL. Hereditary optic neoropathies. **Ophthalmol Clin North Am** 2001. 14:547-68

BLAKELY EL, DE SILVA R, KING A, SCHWARZER V, HARROWER T, DAWIDEK G, TURNBULL DM, TAYLOR RW. LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial MTND1 gene mutation. **Eur J Hum Genet** 2005;13:623–7.

BRANDON, M., BALDI, P., WALLACE, D. C. (2006) "Mitochondrial mutations in cancer". **Oncogene**. 25 (34): 4647-4662

BUGIANI M, INVERNIZZI F, ALBERIO S, BRIEM E, LAMANTEA E, CARRARA F, MORONI I, FARINA L, SPADA M, DONATI MA, UZIEL G, ZEVIANI M. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. **Biochim Biophys Acta**. 2004 Dec 6;1659(2-3):136-47.

CARLSON, N; KURTZ, D.; HEATH, D.; HINES, C. Clinical Procedures for Ocular Examination. **Appleton e Lange**: Norwalk, CT. 1990

CARVALHO, MARIA F. P. DE; RIBEIRO, FERNANDO A. QUINTANILHA. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** , São Paulo, v. 68, n. 2, mar. 2002 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextepid=S0034-2992002000200018&lng=pt&rm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextepid=S0034-2992002000200018&lng=pt&rm=iso)>. Acesso em: 27 nov. 2008. doi: 10.1590/S0034-72992002000200018.

CHAMPE PC., HARVEY, RA. **Bioquímica ilustrada, 2ª ed.** Porto Alegre, Editora Artes Médicas,1997.

CHAN DC. "Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development". 2006 **Cell** **125** (7): 1241–1252. doi:10.1016/j.cell.2006.06.010. PMID 16814712.

CHINNERY PF, TURNBULL DM, HOWELL N, ANDREWS RM. Mitochondrial DNA mutations and pathogenicity. **J Med Genet.**1998 35(8):701-

CHINNERY PF, TURNBULL DM. Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. **Am J Med Genet.** 2001 106(1):94-101.

CHOLDEN, L.S. (1984) - A Psychiatrist Works with Blindness, 4 ed. **American Foundation for the blind**, New York, 1984

CIMERMAN, B. e CIMERMAN, S. 1999. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais. 1ª edição.** Editora Atheneu.

CLINE D; HOFSTETTER HW; GRIFFIN JR. Dictionary of Visual Science. 4th ed. **Butterworth-Heinemann, Boston 1997.** ISBN 0-7506-9895-0

COCK HR, COOPER JM, SCHAPIRA AH. Functional consequences of the 3460-bp mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **J Neurol Sci.** 1999 May 1;165(1):10-7.

DANDONA, L. e DANDONA, R. Revision of visual impairment definitions in the International Statistical Classification of Diseases **BMC Medicine** 2006, 4:7

DANTAS, A. M. **Oftalmologia pediátrica**.Rio de Janeiro;Cultura médica - 1995.

DE ROBERTIS(Jr.), H. P. **Biologia Celular e Molecular**. Guanabara-Koogan: RJ (2003).

DE VRIES DD, WENT LN, BRUYN GW, SCHOLTE HR, HOFSTRA RM, BOLHUIS PA, VAN OOST BA. Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. **Am J Hum Genet** 1996;58:703–11.

DIMAURO S, ZEVIANI M, RIZZUTO R, LOMBES A, NAKASE H, BONILLA E, MIRANDA A, SCHON E. Molecular defects in cytochrome oxidase in mitochondrial diseases. **J Bioenerg Biomembr.** 1988 20(3):353-64. Ed, 2000.

FITZGERALD RG: Reactions to blindness, an exploratory study of adults with recent loss of sight. **Arch Gen Psychiatry** 22:370-379, 1970

FRANÇOIS J. Genética e prevenção da cegueira. In: **IV Congresso Brasileiro de Prevenção da Cegueira**, Belo Horizonte, 1980. Proceedings. Belo Horizonte.

FRICK KD, FOSTER A. The magnitude and cost of global blindness: an increasing problem that can be alleviated. **Am J Ophthalmol.** 2003;135(4):471-6

GILES RE, BLANC H, CANN HM, WALLACE DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1980 77(11):6715-9.

GRAY, H. e CROSS, C.M. **Anatomia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

GROPMAN A, CHEN TJ, PERNG CL, KRASNEWICH D, CHERNOFF E, TIFFT C, WONG LJ. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. **Am J Med Genet A.** 2004 Feb 1;124(4):377-82

GUERRERO, A., CASTRO, M., MARTÍN-ESTEFANÍA, C. Aspecto clínico de las enfermedades mitocondriales . **Rev Neurol** 26 (suppl 1) : S 50-S 60, 1998.

GUY J, QI X, PALLOTTI F, SCHON EA, MANFREDI G, CARELLI V, MARTINUZZI A, HAUSWIRTH WW, LEWIN AS. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. **Ann Neurol.** 2002 52(5):534-42.

GUYTON, ARTHUR C. E HALL, JOHN E., **Tratado de Fisiologia Médica,** 9 Ed., 1997, Guanabara Koogan

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(1):77-86.

HOWELL N, CHINNERY PF, GHOSH SS, FAHY E, TURNBULL DM. Transmission of the human mitochondrial genome. **Humam Reproduction,** 15 (2): 235:245, 2000.

HOWELL N, KUBACKA I, XU M, MCCULLOUGH DA. Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial ND1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. **Am J Hum Genet** 1991;48:935–42.

HOWELL N, MACKEY DA. Low-penetrance branches in matrilineal pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. **Am J Hum Genet.** 1998 63(4):1220-4.

HOWELL, N., BOGOLIN, C., JAMIESON, R., MARENDA, D. R. AND MACKEY, D. A. (1998). mtDNA mutations that cause optic neuropathy: how do we know? **American Journal of Human Genetics** 62(1):196-20

HUOPONEN K. Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. **Neurogenetics.** 2001 3(3):119-25.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico 2000 – Deficiências.** Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/presid.shtm>>. Acessado em 04 fev. 2010

JENUTH JP, PETERSON AC, FU K, SHOUBRIDGE EA. Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. **Nat Genet.** 1996 14(2):146-51.

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. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994;91:6206–10.

JUNQUEIRA LC., CARNEIRO J. (eds). **Histologia Básica, 9ª ed.** Rio de Janeiro, Editora Guanabara

KERRISSON JB, ARNOULD V, BARMADA MM. Genetic heterogeneity of dominant optic atrophy, Kjer type: identification of a second locus on chromosome 18q. **Arch Ophthalmol** 1999. 117: 805-10.

KERVINEN M, HINTTALA R, HELANDER HM, KURKI S, UUSIMAA J, FINEL M, MAJAMAA K, HASSINEN IE. The MELAS mutations 3946 and 3949 perturb the critical structure in a conserved loop of the ND1 subunit of mitochondrial complex I. **Hum Mol Genet.** 2006 Sep 1;15(17):2543-52. Epub 2006 Jul 18

KIM, J. Y., HWANG, J. M. AND PARK, S. S. (2002). Mitochondrial DNA C4171A/ND1 is a novel primary causative mutation of Leber's hereditary optic neuropathy with a good prognosis. **Annals of Neurology** 51(5):630-634.

KIRBY DM, KAHLER SG, FRECKMANN ML, REDDIHOUGH D, THORBURN DR. Leigh disease caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in unrelated families. **Ann Neurol.** 2000 Jul;48(1):102-4

KOMAKI H, AKANUMA J, IWATA H, TAKAHASHI T, MASHIMA Y, NONAKA I, GOTO Y. A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome. **Mitochondrion.** 2003 Mar;2(4):293-304 Koogan, 1999.

LARSSON NG. Leber hereditary optic neuropathy: a nuclear solution of a mitochondrial problem. **Ann Neurol.** 2002 52(5):529-30.

LEBER T. Über hereditäre und congenital angelegte sehnervenleiden. **Albrecht von Graefe's Arch Ophthalmol** 1871; 17: 249–291.

LENAZ G, BARACCA A, CARELLI V, D'AURELIO M, SGARBI G, SOLAINI G. Bioenergetics of mitochondrial diseases associated with mtDNA mutations. **Biochim Biophys Acta.** 2004 Jul 23;1658(1-2):89-94. Review

LEO-KOTTLER, B., LUBERICH, J., BESCH, D., CHRIST-ADLER, M. AND FAUSER, S.. Leber's hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic results in a patient with a point mutation at np T11253C (isoleucine to threonine) in the ND4 gene and

spontaneous recovery. **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology** 2002; 240(9):758-764.

MACKEY DA, BUTTERY RG. Leber hereditary optic neuropathy in Australia. **Aust N Z J Ophthalmol** 1992;20:177-84.

MACKEY DA, OOSTRA RJ, ROSENBERG T, NIKOSKELAINEN E, BRONTE-STEWART J, POULTON J, HARDING AE, GOVAN G, BOLHUIS PA, NORBY S. Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. **Am J Hum Genet.** 1996 59(2):481-5

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. **Am J Hum Genet.** 2003 72(2):333-9.

MAN PY, TURNBULL DM, CHINNERY PF. Leber hereditary optic neuropathy. **J Med Genet.** 2002 39(3):162-9.

MANFREDI G, FU J, OJAIMI J, SADLOCK JE, KWONG JQ, GUY J, SCHON EA. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. **Nat Genet.** 2002 30(4):394-9.

MARRIAGE B, CLANDININ MT, GLERUM DM "Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders". **J Am Diet Assoc** 103 (8): 1029 - 38. doi: 10.1053/jada.2003.50196. (2003) PMID 1289115412891154

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Saúde ano vi - nº 162 - Segunda semana de maio de 2002** Disponível em: <http://bvsm.sau.gov.br/bvs/periodicos/informesaude/informe162.pdf> Acessado em 30 de dezembro de 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Saúde ano vi - nº 162 - Segunda semana de maio de 2002.** Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/informesaude/informe162.pdf>. Acessado em 30 de dezembro de 2009.

MITCHELL AL, ELSON JL, HOWELL N, TAYLOR RW, TURNBULL DM. Sequence variation in mitochondrial complex I genes: mutation or polymorphism? **J Med Genet.** 2006 Feb;43(2):175-9. Epub 2005 Jun 21

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.

NARDIN RA, JOHNS DR . Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. **Muscle Nerve.** 2001 Feb;24(2):170-91.

NETTER, FRANK H. **Atlas de Anatomia Humana. 2 ed.** Porto Alegre: Artmed

NEVES D. **Parasitologia Humana. 11ª edição.** Editora Atheneu, SP 2005.

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(6):750-62.

NEWMAN NJ. Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. **Arch Neurol.** 1993 50(5):540-8.

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(3):504-14.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Causes of blindness and visual impairment [Internet] [Acessado 2009 Dez 30]. Disponível em: <http://www.who.int/blindness/causes/en/index.html>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Visual impairment and blindness** [Internet] [Disponibilizado maio de 2009 - Acessado 2009 Dez 30]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/index.html>

ORSSAUD C. Optic Atrophy. **Orphanet Encyclopedia**. November 2003.

PUOMILA A, HAMALAINEN P, KIVIOJA S, SAVONTAUS ML, KOIVUMAKI S, HUOPONEN K, NIKOSKELAINEN E. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. **Eur J Hum Genet** 2007;15:1079–89.

PYBRIZ RE. **Emery and Rimoin's Practice of Medical Genetics**. Vol I. 3a ed. Churchill Livingstone. New York, 1997 pp: 277-299

QUIROS PA, TORRES RJ, SALOMAO S, BEREZOVSKY A, CARELLI V, SHERMAN J, SADUN F, DE NEGRI A, BELFORT R, SADUN AA. 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. **Br J Ophthalmol**, February 1, 2006; 90(2): 150 - 153.

RESNIKOFF, Serge et al . Global data on visual impairment in the year 2002. **Bull World Health Organ**, Genebra, v. 82, n. 11, Nov. 2004 . Available from <[http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0042-96862004001100009&lng=en&nm=iso](http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0042-96862004001100009&lng=en&nm=iso)>. access on 30 Dec. 2009. doi: 10.1590/S0042-96862004001100009.

RIM, Priscila Hae Hyun; MAGNA, Luis Alberto; RAMALHO, Antonio Sérgio. Genetics and prevention of blindness. **Arq. Bras. Oftalmol.**, São Paulo, v. 69, n. 4, Aug. 2006 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttextepid=S0004-27492006000400005eInq=enrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttextepid=S0004-27492006000400005eInq=enrm=iso)>. access on 30 Dec. 2009. doi: 10.1590/S0004-27492006000400005.

ROSENBERG T. Epidemiology of hereditary ocular disorders. **Dev Ophthalmol.** 2003;37:16-33.

SADUN AA, CARELLI V, SALOMÃO SR, BEREZOVSKY A, QUIROS P, SADUN F, NEGRI AM, ANDRADE R, SCHEIN S, BELFORT JRR. A very large Brazilian pedigree with 11778 Leber's hereditary optic neuropathy. **Transactions of the American Ophthalmological Society Annual Meeting**, EUA, v. 100, p. 169-179, 2002.

SADUN AA, CARELLI V, SALOMÃO SR. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. **Am J Ophthalmol.** 2003;136(2):231-8.

SANTORELLI F M; TANJI K; KULIKOVA R; SHANSKE S; VILARINHO L; HAYS A P; DIMAURO S. Identification of a novel mutation in the mtDNA ND5 gene associated with MELAS. **Biochemical and biophysical research communications** 1997;238(2):326-8.

SARANATH, DHANANJAYA ; BASAK, SUBHANKAR, 2004. **MITOMAP mtDNA Sequence Data.** Disponível em <http://www.mitomap.org/cgi-bin/tbl15gen.pl#20040209005>. Acessado em 30 dez de 2009

SCHARFE C, LU HH, NEUENBURG JK, ALLEN EA, LI GC, KLOPSTOCK T, COWAN TM, ENNS GM, DAVIS RW (2009). "Mapping gene associations in human mitochondria using clinical disease phenotypes". **PLoS Comput Biol.** PMID 19390613.

SEEDORF K, SHERMAN M, ULLRICH A. Protein kinase C mediates short- and long-term effects on receptor tyrosine kinases. Regulation of tyrosine phosphorylation and degradation. **Ann N Y Acad Sci.** 1995 766:459-62. No abstract available.

SHEPHERD, Gordon (Ed.), **The Synaptic Organization of the Brain, 4a edição**, Oxford University Press, NY, 1998

SIMON DK, FRIEDMAN J, BREAKFIELD XO, JANKOVIC J, BRIN MF, PROVIAS J, BRESSMAN SB, CHARNESSE ME, TARSY D, JOHNS DR, TARNOPOLSKY MA. A heteroplasmic mitochondrial complex I gene mutation in adult-onset dystonia. **Neurogenetics**. 2003 Aug;4(4):199-205. Epub 2003 May 17

SIMON, D.K. MARK, M.D, PHD, JOHNS, D.R., MD. Mitochondrial Disorders: Clinical and Genetic features. **Annu. Ver. Med.** 50:111-27, 1999.

SINGH, P.J. , SANTELLA, R., ZAWADA, E.T. Mitochondrial genome mutations and kidney disease. **Am J Kidney Dis** 28:140-6, 1996.

SMITH SE. The role of antioxidants in AMD: ongoing research. **J Ophthalmic Nurs Technol**. 1999 18(2):68-70.

SOBOTTA, J. **Atlas de Anatomia Humana. 21 ed.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2000.

SOUZA AFM, GIUGLIANI R. Doenças Mitocondriais. In: Carakushanski E. **Doenças Genéticas em Pediatria**. Ed. Guanabara Koogan, RJ, 2001. Pp: 189-195.

SOUZA, N.V. e RODRIGUES M LV. Manifestações oculares de doenças sistêmicas. **Medicina, Ribeirão Preto, 30:** 79-83, jan./mar. 1997.

[http://publico.soblec.com.br/index.php?system=newsnews\\_id=643eaction=readeeid=185](http://publico.soblec.com.br/index.php?system=newsnews_id=643eaction=readeeid=185)

SPRUIJT L, KOLBACH DN, DE COO RF, PLOMP AS, BAUER NJ, SMEETS HJ, DE DIE-SMULDERS CE. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. **Am J Ophthalmol**. 2006 141(4):676-82.

SPRUIJT L, SMEETS HJ, HENDRICKX A, BETTINK-REMEIJER MW, MAAT-KIEVIT A, SCHOONDERWOERD KC, SLUITER W, DE COO IF, HINTZEN RQ. A MELAS-associated ND1 mutation causing Leber hereditary optic neuropathy and spastic dystonia. **Arch Neurol** 2007;64:890–3.

TARNOPOLSKY MA, BAKER SK, MYINT T, MAXNER CE, ROBITAILLE J, ROBINSON BH. Clinical variability in maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy with the G14459A mutation. **Am J Med Genet Part A** 2004;124:372–6.

TEMPORINI ER, KARA-JOSÉ N. A perda da visão: estratégias de prevenção. **Arq Bras Oftalmol.** 2004;67(4):597-601.

THARAPHAN P, CHUENKONGKAEW WL, LUANGTRAKOOL K, SANPACHUDAYAN T, SUKTITIPAT B, SUPHAVILAI R, SRISAWAT C, SURA T, LERTRIT P. Mitochondrial DNA haplogroup distribution in pedigrees of Southeast Asian G11778A Leber hereditary optic neuropathy. **J Neuroophthalmol.** 2006 26:2647-7.

TONO T, USHISAKO Y, KIYOMIZU K, USAMI S, ABE S, SHINKAWA H, KOMUNE S. Cochlear implantation in a patient with profound hearing loss with the A1555G mitochondrial mutation. **Am. J. Otol.**, 1998;19:754-7

TORRONI A, PETROZZI M, D'URBANO L, SELBITTO D, ZEVIANI M, CARRARA F, CARDUCCI C, LEUZZI V, CARELLI V, BARBONI P, DE NEGRI A, SCOZZARI R. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. **Am J Hum Genet.** 1997 60(5):1107-21.

TREEM WR, SOKOL RJ. Disorders of the mitochondria. **Semin Liver Dis.** 1998 18(3):237-53.

VALENTINO ML, AVONI P, BARBONI P, PALLOTTI F, RENGO C, TORRONI A, BELLAN M, BARUZZI A, CARELLI V. Mitochondrial DNA nucleotide changes C14482G and C14482A in the ND6 gene are pathogenic for Leber's hereditary optic neuropathy. **Ann Neurol.** 2002 Jun;51(6):774-8

VENTURA DF, GUALTIERI M, OLIVEIRA AG, COSTA MF, QUIROS P, SADUN F, DE NEGRI AM, SALOMAO SR, BEREZOVSKY A, SHERMAN J, SADUN AA, CARELLI V. Male Prevalence of Acquired Color Vision Defects in Asymptomatic Carriers of Leber's Hereditary Optic Neuropathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 2007 48(5):2362-70.

VOET D, JUDITH GV, CHARLOTTE W. Fundamentals of Biochemistry, 2nd Edition. **John Wiley and Sons, Inc.**, 2006. 547. ISBN 0471214957.

WALLACE DC, BROWN MD, LOTT MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. **Gene.** 1999 238(1):211-30.

WALLACE DC, SINGH G, LOTT MT, HODGE JA, SCHURR TG, LEZZA AM, ELSAS LJ 2ND, NIKOSKELAINEN EK. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. **Science.** 1988 242(4884):1427-30.

WALLACE DC. Diseases of the mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Biochem.**, 1992;61:1175-212.

WALLACE DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science.** 1999 283(5407):1482-8.

WEINER NC, NEWMAN NJ, LESSELL S, JOHNS DR, LOTT MT, WALLACE DC. Atypical Leber's hereditary optic neuropathy with molecular confirmation. **Arch Neurol.** 1993 50(5):470-3.

YEN MY, CHEN YJ, LIN CH, WANG AG, WEI YH. Genetic analysis in Leber's hereditary optic neuropathy using the comparative genomic hybridization technique. **Clin Experiment Ophthalmol.** 2003 31(5):435-8.

YU-WAI-MAN P, CHINNERY P. 2008. Leber Hereditary Optic Neuropathy. GeneClinics, **University of Washington LHON online** review October 2000, March 2008

YU-WAI-MAN P, GRIFFITHS PG, HUDSON G, CHINNERY PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. **J Med Genet** (2009) 46:145–158.

ZEVIANI M, TIRANTI V, PIANTADOSI C. Mitochondrial disorders. **Medicine (Baltimore)**. 1998 77(1):59-72

**ANEXO**

---



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

CEP, 18/01/05.  
(Grupo III)

**PARECER PROJETO: N° 690/2004**

**I-IDENTIFICAÇÃO:**

**PROJETO: "ESTUDOS MOLECULAR DA NEUROPATIA ÓPTICA HEREDITÁRIA DE  
LEBER EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS"**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luciene Maria Zanchetta**

**INSTITUIÇÃO: Centro de Estudos e Pesquisas em Reabilitação "Prof. Dr. Gabriel O. S. Porto"-  
CEPRE/ UNICAMP**

**APRESENTAÇÃO AO CEP: 01/12/2004**

**APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/01/06**

**II - OBJETIVOS**

Contribuir para o estudo genético e clínico de famílias brasileiras com diagnóstico bem estabelecido ou presumido de Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON).

**III - SUMÁRIO**

Estudo descritivo exploratório, onde os sujeitos serão divididos em: a) pacientes com quadro clínico característico da LHON (10 a 20 indivíduos) e b) pacientes clinicamente afetados por neuropatia óptica de origem desconhecida (5 a 10 indivíduos), acompanhados no CEPRE/FCM e Ambulatório de Oftalmologia/HC/UNICAMP e serão realizados estudo clínico e estudo molecular.

**IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES**

Apesar de ser um projeto que vai realizar alguns exames laboratoriais, não vimos nenhum senão em relação aos exames nem ao termo de consentimento esclarecido. Além disso será, a nosso ver, muito importante para o diagnóstico das alterações cromossômicas e da LHON. Assim, consideramos eticamente viável tal projeto.

**V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter

aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o 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.

## **VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

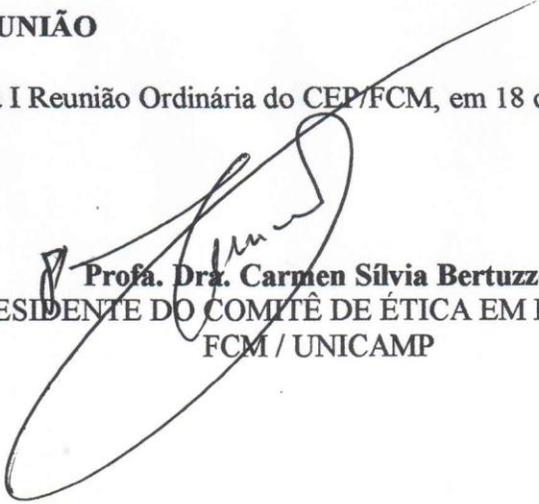
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## **VII - DATA DA REUNIÃO**

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de janeiro de 2005.



**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP