



PAULO MAURÍCIO DO AMÔR DIVINO MIRANDA

**“ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES ASSOCIADAS À
NEUROPATIA ÓPTICA”**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

PAULO MAURÍCIO DO AMÔR DIVINO MIRANDA

“ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES ASSOCIADAS À
NEUROPATIA ÓPTICA”

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção
do Título de Doutor em Genética e
Biologia Molecular, na área de
Genética Animal e Evolução

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edi Lúcia Sartorato

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO PAULO MAURÍCIO
DO AMÔR DIVINO MIRANDA, E ORIENTADA PELA
PROF^ª. DR^ª. EDI LÚCIA SARTORATO

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Edi Lúcia Sartorato", written over a horizontal line.

CAMPINAS
2014

Campinas, 22 de agosto de 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M672a Miranda, Paulo Maurício do Amôr Divino, 1982-
Alterações mitocondriais e nucleares associadas à neuropatia óptica / Paulo
Maurício do Amôr Divino Miranda. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Edi Lúcia Sartorato.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Doenças do nervo óptico. 2. Atrofia óptica hereditária de Leber. 3. Doenças
mitocondriais. 4. Doenças genéticas inatas. I. Sartorato, Edi Lúcia. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mitochondrial and nuclear alterations associated with optic neuropathy

Palavras-chave em inglês:

Optic nerve diseases

Optic atrophy, Hereditary, Leber

Mitochondrial diseases

Genetic diseases, inborn

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Edi Lúcia Sartorato [Orientador]

Lúcio Fábio Caldas Ferraz

Camila Andréa de Oliveira

Arthur Menino Castilho

Katlin Brauer Massirer

Data de defesa: 22-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 22 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Edi Lúcia Sartorato (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz


Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Camila Andréa de Oliveira


Assinatura

Prof. Dr. Arthur Menino Castilho


Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Katlin Brauer Massirer


Assinatura

Prof^ª . Dr^ª. Cláudia Vianna Maurer Morelli

Assinatura

Prof^ª. Dr^ª Maria Isabel de Souza Aranha Melaragno

Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Assinatura

A Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON) e a Atrofia Óptica Autossômica Dominante (ADOA ou OPA1) são doenças caracterizadas pela perda da visão bilateral, devido a uma degeneração do nervo óptico. Ambas as doenças apresentam também acuidade visual reduzida, discromatopsia, palidez do nervo óptico e escotoma central ou centrocecal. A LHON é causada por mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), onde três dessas mutações representam 95% dos casos (mutações primárias principais G11778A, T14484C e G3460A) e as mutações subsequentes representam apenas 5% do total (mutações raras). A ADOA é causada por mutações (mais de 300) no gene nuclear *OPA1*. Embora os mecanismos moleculares precisos envolvidos no desenvolvimento das duas doenças ainda não são bem compreendidos, foi demonstrado que LHON e ADOA possuem um defeito comum de acoplamento da fosforilação oxidativa. Nesses dois casos, a hipótese é de que as mutações no mtDNA e no gene *OPA1* afetariam a integridade mitocondrial, resultando em uma diminuição do fornecimento de energia para os neurônios do nervo óptico. É possível que no Brasil a presença e frequência das alterações relacionadas à LHON e ADOA sejam diferentes das encontradas em outras partes do mundo. Por isso, o presente estudo teve como principais objetivos rastrear mutações e haplogrupos associadas à LHON e detectar mutações no gene *OPA1* em pacientes brasileiros com hipótese diagnóstica de LHON e com Neuropatia Óptica de etiologia a esclarecer. Também foi objetivo otimizar o método de PCR Multiplex Alelo-Específico e padronizar as plataformas de alto rendimento *TaqMan® OpenArray®* e *Iplex Gold/Maldi TOF MS* para o rastreamento da LHON. Foram avaliados 101 pacientes, sendo 67 com hipótese diagnóstica de LHON e 34 com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer. As mutações da LHON foram detectadas por meio de PCR-RFLP e PCR Multiplex Alelo-Específico. As mutações raras da LHON e do gene nuclear *OPA1* (10 principais éxons) foram rastreadas por sequenciamento direto. Foram encontradas mutações da LHON em 36 casos (83.3% com a mutação G11778A e 16.7% com a mutação T14484C). Não foi encontrada a mutação G3460A. Também não foram encontradas mutações raras da LHON e nem mutações relacionadas à ADOA. Haplogrupos de origem africana (L1/L2 e L3) foram mais frequentes no estudo. Foi otimizado o método de PCR Multiplex Alelo-Específico e padronizadas as plataformas *TaqMan® OpenArray®* e *Iplex Gold/Maldi TOF*, os quais se mostraram reprodutivos, eficientes e eficazes. A análise molecular das mutações da LHON e do *OPA1* foi importante para a confirmação do diagnóstico de 35% dos casos clínicos típicos de LHON e para a elucidação de 35% dos casos de neuropatia óptica de etiologia a esclarecer.

The Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) and Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA) are diseases characterized by loss of vision in both eyes due a degeneration of the optic nerve. Both diseases also exhibit reduced visual acuity, dyschromatopsia, optic nerve and central scotoma or centrocecal. The LHON is caused by mutations in mitochondrial DNA (mtDNA), where three of these mutations account for 95% of cases (major primary mutations G11778A, T14484C and G3460A) and subsequent mutations account for only 5% of the total (rare mutations). The ADOA is caused by mutations (more than 300) in the nuclear gene *OPA1*. Although the precise molecular mechanisms involved in the development of the two diseases are not well understood, it was shown that LHON and ADOA have a common defect coupling of oxidative phosphorylation. In both cases, the hypothesis is that mutations in mtDNA and *OPA1* gene affect mitochondrial integrity, resulting in a decrease in the supply of energy to the neurons of the optic nerve. It is possible that in Brazil the presence and frequency of changes related to LHON and ADOA be different from those found in other parts of the world. Therefore, the present study had two main objectives track haplogroups and mutations associated with LHON and detect mutations in the *OPA1* gene in Brazilian patients with a diagnosis of LHON and optic neuropathy of unknown etiology. Another objective was to optimize the method of *PCR Multiplex allele-specific* and standardize platforms high throughput *TaqMan® OpenArray®* and *Iplex Gold/Maldi TOF MS* for screening of LHON. 101 patients were evaluated, 67 with a diagnosis of LHON and 34 with optic neuropathy of unknown etiology. LHON mutations were detected by PCR-RFLP and allele-specific multiplex PCR. Rare mutations of LHON and nuclear gene *OPA1* (top 10 éxons) were screened by direct sequencing. LHON mutations were found in 36 cases (83.3% with the G11778A mutation and 16.7% with the T14484C mutation). Not the G3460A mutation. Nor rare mutations of LHON and ADOA or related mutations were found. Haplogroups of African origin (L1/L2 and L3) were more frequent in the study. The method of allele-specific multiplex PCR was optimized and standardized the *TaqMan® OpenArray®* and *iPLEX Gold/Maldi TOF* platforms which are shown reproductive, efficient and effective. Molecular analysis of mutations of LHON and ADOA was important to confirm the diagnosis of 35% of the typical clinical cases of LHON and to elucidate 35% cases of optic neuropathy of unknown etiology. Besides being useful also in the prognosis of each patient, for the phenotypic expression of the LHON and ADOA may vary with different genetic background in our population of individuals.

RESUMO	VII
ABSTRACT.....	IX
EPÍGRAFE.....	XV
DEDICATÓRIA.....	XVII
AGRADECIMENTOS	XIX
LISTA DE TABELAS	XXIII
LISTA DE FIGURAS	XXV
1 - INTRODUÇÃO	3
1.1 - A VISÃO HUMANA	3
1.1.1 - O OLHO HUMANO E SUAS ESTRUTURAS	3
1.1.2 - A FORMAÇÃO DA IMAGEM	6
1.2 - A PERDA VISUAL	7
1.2.1 - DEFINIÇÃO	7
1.2.2 - PRINCIPAIS CONSEQUENCIAS DA CEGUEIRA.....	8
1.2.3 - ESTIMATIVAS DA PERDA VISUAL.....	9
1.2.3.1 - <i>Perda Visual no mundo</i>	9
1.2.3.2 - <i>Perda visual no Brasil</i>	11
1.2.4 - CAUSAS GENÉTICAS	11
1.3 - A MITOCÔNDRIA.....	12
1.3.1 - CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL	13
1.3.2 - DNA MITOCONDRIAL.....	14
1.3.3 - HOMOPLASMIA <i>VERSUS</i> HETEROPLASMIA	16
1.3.4 - HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS.....	17
1.3.5 - MUTAÇÕES NO DNA MITOCONDRIAL	18
1.4 - NEUROPATIA ÓPTICA HEREDITÁRIA DE LEBER (LHON)	19
1.4.1 - HISTÓRICO	19
1.4.2 - SINTOMAS.....	20
1.4.3 - MUTAÇÕES RELACIONADAS À LHON	22
1.4.4 - MUTAÇÕES PRIMÁRIAS	24
1.4.4.1 - <i>Três principais mutações primárias</i>	24
1.4.4.1.1 - <i>Mutação primária G11778A no gene MT-ND4</i>	25
1.4.4.1.2 - <i>Mutação primária T14484C no gene MT-ND6</i>	26
1.4.4.1.3 - <i>Mutação Primária G3460A no gene MT-ND1</i>	28
1.4.4.2 - <i>Mutações primárias raras</i>	29
1.4.4.3 - <i>Mutações Candidatas</i>	30
1.4.5 - FATORES GENÉTICOS MITOCONDRIAIS	31
1.4.5.1- <i>Heteroplasmia</i>	31

1.4.5.2- Haplogrupos do DNA mitocondrial - LHON	31
1.5 - ATROFIA ÓPTICA AUTOSSÔMICA DOMINANTE (ADOA)	32
1.5.1 - HISTÓRICO	32
1.5.2 - BASES CLÍNICAS	33
1.5.3 - HERANÇA E INCIDÊNCIA.....	35
1.5.4 - FISIOPATOLOGIA	35
1.5.4.1 - Gene OPA1.....	36
1.5.4.2 - Mutações no gene OPA1	36
1.6 - LHON VERSUS ADOA.....	38
1.6.1 - LHON E A ADOA NO BRASIL: ESTUDOS MOLECULARES	39
2 - OBJETIVOS.....	43
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	43
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	47
3.1- CASUÍSTICA	47
3.2 - MÉTODOS.....	48
3.2.1 - EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE SANGUE PERIFÉRICO	49
3.2.2 - RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES PRIMÁRIAS PRINCIPAIS	51
3.2.2.1 - Mutação G11778A no gene MT-ND4	51
3.2.2.2 - Mutação T14484C no gene MT-ND6	52
3.2.2.3. Mutação G3460A no gene MT-ND1	54
3.2.3 - RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES PRIMÁRIAS RARAS E MUTAÇÕES CANDIDATAS DA LHON.....	56
3.2.3.1. Amplificação das regiões de interesse	57
3.2.3.2. Sequenciamento automático.....	57
Purificação dos produtos de PCR	57
Reação de sequenciamento automático para produto de PCR	58
3.2.3.3 Análise das sequências obtidas	59
3.2.4 - OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PCR MULTIPLEX ALELO-ESPECÍFICO PARA DETECÇÃO DAS TRÊS PRINCIPAIS MUTAÇÕES PRIMÁRIAS	59
3.2.5 - Padronização da plataforma TAQMAN® OPENARRAY™ genotyping	61
3.2.5.1 - Preparação das amostras.....	61
3.2.5.2 - Desenho e Síntese dos ensaios	61
3.2.5.3 - Concentração, pureza e diluição das amostras	63
3.2.5.4 - Genotipagem com a plataforma TaqMan® OpenArray® Genotyping	64
3.2.5 - PADRONIZAÇÃO DA PLATAFORMA ESPECTROMETRIA DE MASSA IPLEX GOLD/MALDI TOF MS (SEQUENOM INC.-SAN DIEGO, CA).....	66
3.2.5.1 - Princípio da Genotipagem usando o System® MassArray da Sequenom, Inc. (San Diego, CA)	67
3.2.5.2 - Realização dos ensaios	69
3.2.5.2.1 - Definição dos ensaios e Preparo das Amostras	69
3.2.5.2.2 - Amplificação dos produtos contendo as alterações	69
3.2.5.2.3 - Tratamento com SAP	70
3.2.5.2.4 - Reação de extensão - iPLEX	70
3.2.5.2.5 - SpectroCHIP	70
3.2.5.2.6 - Análise dos resultados	71

3.2.6 - DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PLATAFORMA <i>IPLEX GOLD/MALDI TOF MS</i> (SEQUENOM INC.-SAN DIEGO, CA) PARA A DETECÇÃO DAS TAXAS DE HETEROPLASMIA.....	71
3.2.7 - RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À ADOA NO GENE NUCLEAR <i>OPA1</i>	72
4. RESULTADOS	77
4.1 - RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES PRIMÁRIAS.....	77
4.1.1 - MUTAÇÃO G11778A NO GENE <i>MT-ND4</i>	78
4.1.2 MUTAÇÃO T14484C NO GENE <i>MT-ND6</i>	78
4.1.3 - MUTAÇÃO G3460A NO GENE <i>MT-ND1</i>	79
4.2 - RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES PRIMÁRIAS RARAS E MUTAÇÕES CANDIDATAS DA LHON.	79
4.2.1 - OUTRAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS	80
4.2.1.1 - Alteração C4167T no gene <i>MT-ND1</i>	80
4.2.1.2 - Alteração T11697C no gene <i>MT-ND4</i>	81
4.2.1.3 - Alteração G11719A no gene <i>MT-ND4</i>	82
4.2.1.4 - Alteração G14560A no gene <i>MT-ND6</i>	83
4.3 - OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PCR MULTIPLEX ALELO-ESPECÍFICO PARA O RASTREAMENTO DAS MUTAÇÕES PRIMÁRIAS	85
4.4 - PADRONIZAÇÃO DA PLATAFORMA DE GENOTIPAGEM <i>TAQMAN® OPENARRAY® GENOTYPING</i> PARA O RASTREAMENTO DAS TRÊS PRINCIPAIS MUTAÇÕES PRIMÁRIAS DA LHON.	86
4.5 - PADRONIZAÇÃO DA PLATAFORMA DE ESPECTROMETRIA DE MASSA <i>IPLEX GOLD/MALDI TOF MS</i> (SEQUENOM INC.- SAN DIEGO, CA).....	88
4.5.1 - RASTREAMENTO DE 11 MUTAÇÕES PRIMÁRIAS DA LHON.....	88
<i>Figura 33 - Padrão gráfico gerado pelo software MassArray® Typer 4.0 no rastreamento da mutação primária T14484C. a) Indivíduo normal / b) Indivíduo mutante. Linha tracejada em azul representa na figura A a base T e na figura B a base C.</i>	90
4.5.2 - RASTREAMENTO DOS HAPLOGRUPOS MITOCONDRIAIS HUMANOS	90
4.5.3 - DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PLATAFORMA <i>IPLEX GOLD/MALDI TOF MS</i> (SEQUENOM INC.-SAN DIEGO, CA) PARA A DETECÇÃO DE BAIXAS TAXAS DE HETEROPLASMIA.	91
4.6 - RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES RELACIONADAS À ADOA NO GENE NUCLEAR <i>OPA1</i>.	94
4.6.1 - OUTRAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS	94
4.6.1.1 - Polimorfismo rs73205350.....	94
4.6.1.2 - Polimorfismo rs34222475.....	95
4.6.1.3 - Polimorfismos rs10451941, rs166850 e rs76253392	96
5. DISCUSSÃO	103
6. CONCLUSÃO	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXO 1	139
ANEXO 2	143

“De onde ela vem? Essa busca. A necessidade de desvendar os mistérios da vida, quando as coisas mais simples nunca serão respondidas. Por que estamos aqui? O que é a alma? Por que sonhamos? Talvez seja melhor não procurarmos respostas. E não seguirmos esse desejo de saber. Mas a natureza humana não é assim. Nem o coração dos homens. Não é por isso que estamos aqui. Mesmo assim, lutamos para fazer a diferença, para mudar o mundo e para ter esperança. Mas nunca sabemos quem vamos achar pelo caminho. Quem dentre tantos estranhos vai segurar as nossas mãos? Quem vai tocar nossos corações? E compartilhar o sofrimento de tentar? Então, tudo acontece. O sonho se torna realidade. E a resposta para essa busca e para desvendar os mistérios da vida finalmente se revela, com a luz crescente de um novo amanhecer. Tanto o esforço para acharmos o significado e propósito. E, no final, achamos isso uns nos outros. Nessa jornada que fizemos pelo fantástico. E pelo mundano. É a necessidade humana de achar semelhante. Para nos unirmos e para sabermos dentro de nossos corações que não estamos sozinhos.”

“Heroes”

*A minha linda esposa Maria Izabela,
Minha família e aos meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço toda oportunidade e confiança depositada em mim pela Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato. Sempre tive todo suporte e liberdade para desenvolver minha tese, meus projetos e principalmente realizar meu sonho. A Dra. Edi sempre foi muito acessível, dedicada, companheira e acima de tudo excelente profissional. Tenho certeza que aprendi muito sobre respeito, responsabilidade, dinamismo e profissionalismo nesses oito anos de convivência.

À minha base, o meu pilar, minha sustentação e inspiração para tudo que eu luto e conquistar na vida, minha linda esposa Maria Izabela Neves Miranda. Ela sim esteve sempre ao meu lado em todos os momentos. Nos momentos bons, nos ruins, nas horas felizes, nas horas tristes, nas horas que eu tava chato... Enfim, ela sempre estava lá, seja de madrugada com carinho de sono ao meu lado, seja trazendo um lanchinho, seja me dando força, seja me falando a coisa certa a se dizer. Agradeço muito a Deus por ter a esposa que tenho.

Claro que também devo creditar grande parte do que sou aos meus pais Antônio Miranda e Cristina do Amôr Divino. Meu caráter, minha personalidade, meus sonhos e minha forma de ver a vida, tudo isso aprendi com eles. E ainda mais justo que agradecer a eles por tudo que me deram, é poder vencer na vida para retribuir. E vou chegar lá.

A toda minha família, meus irmãos Jorge, Enilson, Rosane, Rita, Edenilson; meus sobrinhos Lorena, Isis, Isabela, Matheus, João Victor, Melissa, Pedrinho, Kayo, Luisa, Rafael e Geisa; Aos meus cunhados Marivaldo, Ademir, Marina, Rosângela, Tuxê, Tiago e Lilian; Aos meus tios, tias, primos e primas (de Salvador e Belo Horizonte). A minha sogra Didina. Com certeza sei que sou abençoado pela família que tenho.

Não posso esquecer os irmãos Bazukas da velha guarda: Zélo, Creyto, e Didi. E também tenho que citar os irmãos da nova geração: Fábio Gordão, Brutus, Batatinha, Chaves e Juanito. Obrigado por todas as conversas, ajudas, conselhos valorosos, ensinamentos e companheirismo.

Bruna e Vanessa, não posso nunca deixar de falar de vocês. Quantos anos? 12 anos de amizade verdadeira. Cada um com uma personalidade, mas sempre nos completamos.

Risadas, brigas, bagunças, Ipaussuramas lotados perto do terminal central, mais risadas, tosquices, Instituto Biológico, ônibus azul cheio de anciões, “para Paulô”, pãozinho com queijo e presunto... Nossa, foram tantas coisas que passamos. E lá vamos nós para mais uma etapa. Muito obrigado por dividirem isso tudo comigo.

Agradeço demais a minha atual equipe e amigos do laboratório: Sueli, Priscila Jacob, Carol, Tia Nath, Lilian Bilula, Paulinha Adamov, Pri Zonzini, Ju Pitante, Alessandra e aos Bazukas. Ah, incluo a menina Pam aqui também. Não tem palavras para agradecer a vocês por tudo, toda ajuda e suporte que vocês sempre me deram. Não posso esquecer a confiança, todas as conversas, todas as bagunças, risadas, confissões e tudo que passamos todos os dias. Como sempre falamos: vocês são a minha família fora de casa. O mais interessante disso é que somos tão diferentes, cada um de um lugar, com um sotaque, um jeito de ver a vida e uma personalidade distinta, mas cada dia que passa vejo que somos mais parecidos. Estamos ficando cada vez mais iguais não somente pelo sonho em comum que nos une, mas principalmente pela amizade e admiração que sei que sentimos uns pelos outros. Valeu galera.

Claro que agradeço muito à Dra. Marcela Scabello não somente pela colega e profissional que sempre estive próximo quando precisei, mas também pela grande amiga que se tornou nessa longa caminhada. Obrigado Marcela por tudo.

Agradeço também a todos os amigos e colegas de laboratório que de alguma forma fizeram parte da minha caminhada. Seja lá no comecinho ou agora próximo ao fim, cada um que será citado teve pelo menos um pedacinho de contribuição nessa jornada. Mara, Reginaldo, Débora, Flor, Taci, Cris, Luana, Helena, Aliane, Foca, Ana Letícia, Dra. Adriana, Rose, Flávia Elfo, Nath Graviola, Dê Tamagóxi, Mari Codorna, Pri II, Cintia, Xuxa, Renata Sol, Mathias, Gilmar, Daí Belgini, Luli, Fer II, Fer III, Vanessinha, Gleice, Fer IV, Carolzinha (dá nojo em porco), Uiara, Rodrigo, Creidy, Creuza, Paula, Jéssica, Carol Lincon, Renan, Francine, Milena, Vitor, Eduardo Fido, Luciene, Renata, Dra Juliana, Caio, Ianik, André Belezinha, Rafa (vendedora) e vários outros que não citei os nomes, mas passaram pelo laboratório. Vocês me ensinaram muito, não somente na área profissional, mas também em amizade, respeito e convivência com o próximo. Vou levar sempre um pouquinho de vocês para o resto da minha vida.

A função de um monitor/professor é apenas ensinar? Não, também é aprender. E foi o que fiz com todos os meus alunos do CAF e PICjr. Maísa, Virginia, Vanessa Barbosa, Carol Vida Loka, Allan, Carol Conti, Suelen, Victor, Maria Rita (Á lá!!!), Karen, Byy Neves, Andreza Dolly, Fran, Jô Zanirato, Lucas, Pedro, Vanessa e Pam (Ligeirinha). Mais que ensinar vocês, pude aprender demais. Acho que por mais que eu escreva, vocês nunca terão a noção do tanto que aprendo com vocês. Além da amizade que conquistei para sempre da maioria de vocês, tenho uma satisfação enorme em ver que cada um de vocês está evoluindo, seguindo um caminho brilhante. Usando o grande potencial para correr atrás do enorme futuro que vocês têm pela frente. Fico orgulhoso por vocês terem feito parte da minha vida.

À professora Maricilda pela ajuda que me deu em todo esse tempo. Tenho muita admiração por todo profissionalismo, por toda dedicação e por ser uma ótima pessoa, sempre disposta a ajudar. Muito obrigado professora.

A todos os funcionários, professores e alunos do CBMEG. Agradeço especialmente às meninas da secretaria Sandra, Tânia, Gabi e Letícia. Sei que enchi muito o saco de vocês. E mesmo assim todos vocês me ajudaram de alguma forma sempre que precisei, muito obrigado.

Ao Dr. Arthur Castilho, primeiramente por ter aceitado o convite. Mas também agradeço por ter contribuído e muito nessa caminhada (fez parte da Qualificação no mestrado, Qualificação e Pré-Banca no Doutorado, e agora está presente na minha Defesa de Tese). Ajudou-me muito, sempre com comentários e dicas muito úteis e pertinentes, fazendo muitas vezes ter outra visão da minha Tese. Tenho sempre que agradecer.

À Dra. Katlin Brauer Massirer também por ter aceitado o convite. Sempre se mostrou disponível e muito disposta a ajudar. Agradeço muito por todos os conselhos na Pré-Banca e por todo enriquecimento que as sugestões dadas trouxe à minha Tese. E tenho certeza que ainda vai contribuir muito pela excelente profissional que sempre foi. Agradeço muito.

Ao Dr. Lúcio Ferraz por toda disponibilidade em participar dessa fase tão importante da minha vida profissional e acadêmica. Sempre tentei ter o Dr. Lúcio nas minhas bancas por tudo que sempre escutei de positivo dele, mas nunca tive a oportunidade. Mas fico feliz

por dessa vez ter dado certo. Sei que vai acrescentar muito. Muito obrigado por ter aceitado o convite.

À Dra. Camila Andréa Oliveira. Assim como falei na Defesa do Mestrado, a Dra. Camila sempre foi um exemplo para mim. Quando dei o primeiro passo e entrei no laboratório, lá no comecinho, cheio de sonhos e incertezas, olhava para a Dra. Camila e via um exemplo a seguir. E nesse que é um passo muito importante para o desfecho dessa etapa, é um privilégio tê-la novamente fazendo parte desse momento. Fico muito grato por ter aceitado mais uma vez o convite.

Aos membros suplentes também por toda disposição e boa vontade em fazerem parte da minha banca. Dra. Cláudia Morelli, Dra. Laura Ottoboni e Dra. Maria Isabel Melaragno, agradeço demais por terem aceitado o convite. Estão fazendo parte de um momento único na minha vida.

Às agências financiadoras CAPES e FAPESP.

A Deus por toda força, determinação, sabedoria e principalmente por ter me dado a oportunidade. Sempre que achei que não tinha saída era em Deus que eu confiava. E sempre um caminho de luz se abriu na minha frente. Obrigado meu Deus por mais esta vitória na vida.

Enfim, obrigado a todos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cinco complexos enzimáticos da cadeia respiraria mitocondrial.....	13
Tabela 2 - Mutações mitocondriais relacionadas à LHON.....	24
Tabela 3 - Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região 11778 do gene <i>MT-ND4</i> . 51	
Tabela 4 - Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região 11778 do gene <i>MT-ND4</i> . 53	
Tabela 5 - Sequência de <i>primers</i> para a amplificação da região 3460 do gene <i>MT-ND1</i> . ..	54
Tabela 6 - Mutações primárias raras e mutações candidatas rastreadas no estudo	56
Tabela 7 - Mutações primárias raras e candidatas e seus respectivos <i>primers</i>	57
Tabela 8 - <i>Primers</i> do método de PCR Multiplex Alelo-Específico usado no rastreamento das mutações primárias da LHON.	60
Tabela 9 - Principais mutações primárias da LHON e suas sequências.	62
Tabela 10 - Sequência dos <i>primers</i> e sondas utilizados para genotipagem na Plataforma <i>TaqMan</i> ® <i>OpenArray</i> ®	63
Tabela 11 - Haplogrupos e seus respectivos marcadores	67
Tabela 12 - Ensaio contendo diferentes proporções (%) de DNA normal e DNA mutante.	72
Tabela 13 - Lista de éxons estudados do gene <i>OPA1</i> e suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento.	73
Tabela 14 - Resumo dos resultados encontrados para o rastreamento das três principais mutações primárias.....	77
Tabela 15 - Haplogrupos mitocondriais encontrados em pacientes mutantes e normais	91
Tabela 16 - Alterações no gene <i>OPA1</i> que poderiam ser encontradas no presente estudo.	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração de um corte longitudinal do olho humano evidenciando suas principais estruturas.....	6
Figura 2 - Esquema da dupla cadeia do DNA mitocondrial, evidenciando as cadeias pesada e leve.....	16
Figura 3 - Diagrama da história migratória dos haplogrupos do mtDNA humano.....	18
Figura 4 - Exame de Oftalmoscopia mostrando fundo do olho normal e na fase aguda da LHON.....	22
Figura 5 - Posição do Gene <i>MT-ND4</i> no DNA mitocondrial	25
Figura 6 - Posição do Gene <i>MT-ND6</i> no DNA mitocondrial	27
Figura 7 - Posição do Gene <i>MT-ND1</i> no DNA mitocondrial	28
Figura 8 - Fundoscopia mostrando nervo óptico de indivíduo portador da ADOA.....	34
Figura 9 - Esquematização do posicionamento do gene <i>OPAI</i> no cromossomo 3.....	36
Figura 10 - Esquema da estratégia principal dos testes moleculares no rastreamento das principais alterações relacionados à LHON e à ADOA.	49
Figura 11 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11778A.....	52
Figura 12 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T14484A.....	53
Figura 13 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G3460A.....	55
Figura 14 - Ciclos utilizados no sequenciamento.	58
Figura 15 - Padrão de bandas da PCR multiplex Alelo-Específico para as mutações primárias da LHON	60
Figura 16 - Imagem gerada pelo software <i>OpenArray™ SNP Genotyping Analysis</i>	66
Figura 17 - Esquematização da <i>iPLEX® Gold Assay</i> por meio da técnica <i>MALDI-TOF MS</i>	68
Figura 18 - Padrão de bandas para a mutação G11778A por PCR-RFLP	78
Figura 19 - Padrão de bandas para a mutação T14484C por PCR-RFLP.....	79
Figura 20 - 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.	80
Figura 21 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.	81
Figura 22 - 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.	82
Figura 23 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração T11697C. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.....	82
Figura 24 - 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.	83
Figura 25 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração G11719A. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.....	83

Figura 26 - 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.	84
Figura 27 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração G14560A.	84
Figura 28 - Padrão de bandas da reação de PCR Multiplex Alelo-Específico para o rastreamento das mutações primárias da LHON	85
Figura 29 - Gráfico gerado pelo software <i>TaqMan® Genotyper</i> para a mutação primária G11778A.....	87
Figura 30 - Gráfico gerado pelo software <i>TaqMan® Genotyper</i> para a mutação primária T14484C.....	87
Figura 31 - Gráfico gerado pelo software <i>TaqMan® Genotyper</i> para a mutação primária G3460A	88
Figura 32 - Padrão gráfico gerado pelo software <i>MassArray® Typer 4.0</i> no rastreamento da mutação primária G11778A.....	89
Figura 33 - Padrão gráfico gerado pelo software <i>MassArray® Typer 4.0</i> no rastreamento da mutação primária T14484C.....	90
Figura 34 - Padrão gráfico gerado pelo software <i>MassARRAY® Typer 4.0</i> para o rastreamento da mutação G11778A em baixas taxas de heteroplasmia.	92
Figura 35 - Padrão gráfico gerado pelo software <i>MassARRAY® Typer 4.0</i> para o rastreamento da mutação T14484C em baixas taxas de heteroplasmia.....	93
Figura 36 - Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs73205350.....	94
Figura 37 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs73205350. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.....	95
Figura 38 - Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs34222475.....	96
Figura 39 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs34222475. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.....	96
Figura 40 - Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs10451941.....	97
Figura 41 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs10451941. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.....	97
Figura 42 - Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs166850.....	98
Figura 43 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs166850. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.....	98
Figura 44 - Comparação de imagens do <i>CLC Sequence Viewer</i> mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs76253392.....	99
Figura 45 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs76253392. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µL	Microlitro
(H)	Cadeia pesada do DNA Mitocondrial
(L)	Cadeia leve do DNA Mitocondrial
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ADOA	<i>Autosomal Dominant Optic Atrophy</i> - Atrofia óptica autossômica dominante
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	ATP sintetase
AV	Acuidade Visual
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
COX	Citocromo c oxidase
CV	Campo Visual
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desorribonucleotídeo trifosfatados
EDTA	Ácido Etileno Diamono Tetracético
FAD	Dinucleotídeo adenina-flavina
FADH2	Dinucleotídeo adenina-flavina oxidada
G	Gramas
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico
Kb	Quilobase
kDa	Kilodalton
L	<i>Ladder</i>
L	Litro
LHON	<i>Leber hereditary optic neuropathy</i> - Neuropatia Óptica Hereditária de Leber
M	Massa molar
M	Mutante
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry
MELAS	Encefalomiopatia Mitocondrial, Acidose láctica, Episódios semelhantes acidente vascular cerebral
Mg	Micrograma
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Min.	Minuto
mL	Mililitro

mM	Milimolar
Mm	Milímetro
MmHg	Milímetros de mercúrio
MT-ATP6	Gene mitocondrial codificante de ATP sintase 6
MT-CO3	Gene mitocondrial codificante de Citocromo C oxidase III
MT-CYB	Gene mitocondrial do Complexo Citocromo b-c1
MtDNA	DNA Mitocondrial
MT-ND1	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 1
MT-ND2	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 2
MT-ND3	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 3
MT-ND4	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4
MT-ND4L	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 4L
MT-ND5	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 5
MT-ND6	Gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 6
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida
NADH	Dinucleotídeo adenina-nicotinamida oxidada
NARP	Neuropatia, ataxia e retinose pigmentar
nDNA	DNA nuclear
Ng	Nanograma
nL	Nanolitro
nM	Nanomolar
OPA1	gene optic atrophy type 1 - Gene da atrofia óptica tipo 1
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR-RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição
p-ganglionares	Parvo ganglionares
pH	Potencial de hidrogênio iônico
Pi	Fosfato inorgânico
REDOX	Redução-Oxidação ou Oxirredução
RNA	Ácido Ribonucléico
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
Seg	Segundo
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima polimerase)
TBE	Tris, Base, Ácido Bórico, EDTA
TE	Tris EDTA

T_m	Temperatura de <i>melting</i> (fusão)
TOF	<i>Time of Fly</i> - Tempo de voo
U	Unidade
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
V	Volts

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A visão humana

O sentido da visão possibilita que os seres vivos percebam com maior e melhor exatidão o ambiente que os cerca. Esse sentido age através de um conjunto de mecanismos neurológicos e fisiológicos que captam radiações luminosas e determinam as mais diversas impressões sensoriais. Com a visão é possível receber e processar informações externas muito variadas e específicas, como por exemplo, distinguir formas, cores, movimento, distância, profundidade e muitas outras.

Essa capacidade magnífica só é possível por causa de um órgão com alto nível de desenvolvimento evolutivo, complexidade e grau de sensibilidade elevado: o olho. Nos seres humanos, o olho desempenhou grande papel na evolução da espécie. Pois além de tornar os humanos aptos a enxergar, os olhos os ajudam a compreender o mundo de forma mais precisa.

O olho humano é formado por estruturas extremamente especializadas que unidas e coordenadas desempenham papel vital no processo sofisticado de captação, desvio, focalização e transformação da luz em imagens.

1.1.1 - O olho humano e suas estruturas

Por serem extremamente sensíveis, os olhos humanos precisam de proteção e essa função é desempenhada por algumas de suas estruturas especializadas. A primeira delas é a órbita, que é um par de proeminências ósseas formadas pelas junções de partes dos ossos palatino, maxilar, zigomático, etmóide, frontal, esfenóide e lacrimal. A junção desses ossos forma cavidades perfeitas onde estão alocados os olhos. Além das orbitas, os olhos também estão protegidos pelas pálpebras, que são constituídas por um tecido músculo-fibroso, revestidas internamente pela membrana conjuntiva e externamente por pele e possuem nas suas bordas os cílios. Os cílios são pêlos que não permitem que excessos de luz emitidos de determinados ângulos entrem nos olhos e evitam que partículas estranhas cheguem ao globo ocular. E finalizando o sistema básico de proteção, estão as sobrancelhas, que

localizadas acima dos olhos, não permitem que quantidades relativas de partículas e líquidos (principalmente suor) desçam para os olhos (Dantas, 1995; Gray, 1998; Sobotta, 2000).

O movimento dos olhos é coordenado por um conjunto de seis músculos extraoculares que estão localizados ao redor do globo ocular. A contração desses músculos (que pode ser voluntária) dá ao olho a capacidade de se mover em qualquer direção e aumentar para cerca de 180 graus o campo visual (Dantas, 1995; Gray, 1998).

O globo ocular apresenta, aderidas entre si, três camadas concêntricas com a função de visão, nutrição e proteção. São elas, a camada externa, a camada média e a camada interna. A camada externa tem a função de proteção e é formada pela membrana conjuntiva, pela esclera e pela córnea. A camada média ou vascular é formada pela coróide, cório, íris e o corpo ciliar. E, por fim, a camada interna que é formada pela retina e tem desempenho relacionado às funções nervosas (Dantas, 1995; Gray, 1998; Sobotta, 2000).

Para que tenha formato esférico e fique distendido, o globo ocular precisa da pressão interna exercida pelo líquido intraocular. Esse líquido é formado pelo 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 intraocular (Netter, 2000; Sobotta, 2000).

Revestindo a parte interna da pálpebra e a superfície da esclerótica, a membrana conjuntiva (túnica conjuntiva) tem a função de lubrificação ocular e defesa da superfície ocular contra agentes externos. Do exterior para o interior, está a esclera (túnica externa branca, opaca e fibrosa). A esclera possui consistência rígida, por isso é responsável pela manutenção da forma do olho e pela proteção das estruturas oculares.

Uma associação entre a córnea e o cristalino forma uma espécie de lente que compõe o sistema óptico responsável por focalizar as imagens na retina. Individualmente, a córnea faz parte da camada externa do olho, tendo como funções a realização da transmissão e refração da luz e a participação na proteção da parte anterior do globo ocular. O cristalino, por sua vez, permite a possibilidade da visão precisa de objetos próximos ou distantes, ou seja, ele regula o foco dos objetos conforme a distância que eles estão dos olhos (Netter, 2000; Sobotta, 2000).

A pupila é um orifício regulável por onde atravessam os raios luminosos procedentes do meio externo. A necessidade momentânea de luz para formação da imagem é que determina o tamanho da pupila. Esse tamanho é alterado pela contração e relaxamento muscular da íris, que está localizada no centro da pupila. Quando há pouca luz externa a pupila se dilata para que uma maior quantidade de luminosidade chegue ao interior do olho. Quando há muita luminosidade a pupila se contrai e não permite que muita luz chegue à retina (Guyton et al., 1997).

Desenvolvendo possivelmente o papel mais importante na formação da visão, a retina é a camada formada por células fotossensoras e envolve internamente 75% do globo ocular. As células fotossensoras presentes na retina são os bastonetes e os cones. Os bastonetes são células que tornam possível a formação da visão em preto e branco e também a visão noturna. Os cones são responsáveis por proporcionar visão em cores (Dantas, 1995). Os raios paralelos que penetram no olho se encontram na retina, mais precisamente em uma região de extrema importância para a visão, a fóvea central. A fóvea é composta por um cone para a cor vermelha, um para a verde e outro para a cor amarela. Na fóvea a acuidade visual ideal para a geração da imagem considerada perfeita para os humanos é obtida: 20/20. Quanto mais distante da fóvea menor vai ser a concentração de cones, conseqüentemente diminuindo a acuidade visual. Em regiões mais distantes, como a periferia da retina, a acuidade visual pode ser de apenas 1/10 (20/200), propiciando uma visão deficiente. Próximo à fóvea está localizado o ponto cego, que assim é chamado por causa da ausência de receptores sensoriais responsáveis por responder aos estímulos visuais. Outro ponto importante é que nesta região acontece a ligação entre a retina e o nervo óptico (Dantas, 1995; Sobotta, 2000; Netter, 2000). O nervo óptico é formado por um grupo de fibras nervosas e artérias e tem como atividade principal transportar as sensações visuais do olho para o cérebro, isto é, desenvolve uma função unicamente sensitiva, pois conduz a luz captada pela retina e fóvea para o córtex cerebral (Aumont, 1995; Netter, 2000).

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

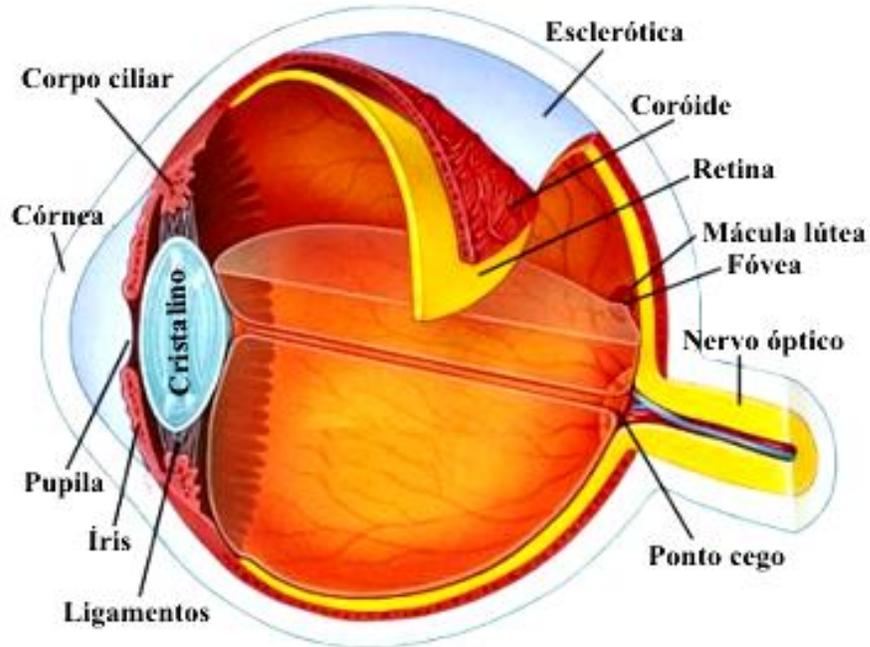


Figura 1 - Ilustração de um corte longitudinal do olho humano evidenciando suas principais estruturas. Modificado de Espírito Santo e colaboradores (2010)

1.1.2 - A formação da imagem

A formação da imagem é um processo altamente especializado e delicado, em que todas as estruturas envolvidas precisam estar funcionando perfeitamente e, principalmente, estar trabalhando em completa harmonia entre elas.

Esse processo de formação da imagem tem início quando a luz proveniente do ambiente externo chega à córnea, vindo de diversas direções e com diferentes intensidades. Essa luz atravessa o humor aquoso, passa pela pupila, que regula a quantidade de luz penetrante, e chega ao cristalino. Por sua vez, o cristalino age como lente de focalização que converge os feixes luminosos para um ponto focal localizado na retina, a fóvea. A energia luminosa chega de forma invertida nessa região. Na região da retina estão localizados mais de cem milhões de células fotossensíveis conhecidas como cones e bastonetes. Essas células fotossensíveis convertem a energia luminosa em impulsos eletroquímicos. O nervo óptico se encarrega de levar esses impulsos ao cérebro, mais

precisamente no córtex cerebral. É no córtex que ocorre o processamento das imagens recebidas pelos olhos, de modo que a imagem antes invertida seja processada da forma correta. O cérebro então após processar os impulsos recebidos, os transforma em imagem com riquezas de detalhes. Por isso é possível distinguir formas, cores, intensidades luminosas, relevo, entre outras (Aumont, 1995; Dantas, 1995; Guyton et al., 1997; Sobotta, 2000; Netter, 2000).

1.2 - A perda visual

1.2.1 - Definição

Segundo a Organização Mundial de Saúde, OMS, a função visual pode ser dividida em quatro níveis. Esses níveis são a visão normal, a deficiência visual moderada, a deficiência visual grave e a cegueira.

Para um indivíduo ser enquadrado em um desses níveis, é preciso avaliar a Acuidade Visual (AV) do mesmo. Essa acuidade é determinada pela menor imagem retiniana percebida pelo indivíduo e sua medida é dada pela relação entre o tamanho do optotipo (menor objeto) visualizado e a distância entre esse objeto e os olhos. A medida objetiva da quantidade de visão é representada em uma fração onde o numerador é o número 20, que é a distância em pés entre o observador e o objeto (representa 6 metros), e o denominador é o tamanho do optotipo. Quanto maior for o denominador menor será a acuidade. Portanto, se um indivíduo tiver a AV em torno de 20/20 terá uma visão considerada normal. Quando a acuidade for próxima da 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 & Dandona 2006).

Definida como a ausência do sentido da visão, a cegueira é caracterizada pela perda ou privação congênita, total ou parcial, temporária ou permanente da visão, que pode decorrer de lesão no próprio olho, nas vias ópticas ou nos centros nervosos superiores. A perda visual pode ter origem de quatro maneiras distintas, são elas: traumas oculares (choques físicos, ação de corpos estranhos e exposição às substâncias nocivas), doenças

infecciosas (tracoma, oncocercose, etc), doenças sistêmicas (diabetes, hipertensão arterial, etc) e causas congênitas (diversas formas de malformações oculares, catarata congênita, glaucoma congênito e neuropatia óptica hereditária de Leber) (Souza & Rodrigues, 1997; Cimerman & Cimerman, 1999; Orssaud, 2003; Neves, 2005; OMS, 2013).

1.2.2 - Principais consequências da cegueira

A cegueira tem consequências negativas importantes no que diz respeito à saúde pública. A principal influência ocorre diretamente no desenvolvimento social e econômico das pessoas afetadas (Salomão et al 2009).

Segundo estudos publicados por Fitzgerald, em 1970, e Cholden, em 1984, os indivíduos afetados pela perda visual, enfrentam problemas psicopatológicos importantes. Esses problemas que afetam a qualidade de vida dos indivíduos são divididos em quatro fases:

- Primeira fase: descrença (paciente geralmente nega a cegueira);
- Segunda fase: protesto (pacientes procuram outras opiniões profissionais e não aceitam formas de auxílio, como braile, e/ou objetos, como bengalas);
- Terceira fase: depressão (paciente deixa de viver normalmente);
- Quarta fase: recuperação (paciente aceita a cegueira).

Das fases citadas acima, a terceira fase é a mais preocupante, pois os indivíduos têm a tendência de se isolar em relação às outras pessoas, se afastar das atividades que realizava anteriormente e, em muitos casos, cogitam a possibilidade de suicídio. Já a fase de recuperação, enumerada como quarta e última fase, pode ocorrer realmente após as três fases anteriores ou em qualquer outro momento. O tempo entre as fases citadas pode variar de pessoa para pessoa e está diretamente ligada às possibilidades de desenvolvimento, ou não, de distúrbios psicopatológicos graves e/ou irreversíveis (Fitzgerald, 1970; Cholden, 1984).

1.2.3 - Estimativas da perda visual

1.2.3.1 - Perda Visual no mundo

A Organização Mundial de Saúde, atendendo a um pedido da 28ª Assembleia Mundial da Saúde, criou em 1975 a Agência Internacional para Prevenção da Cegueira (IAPB). A IABP tinha como função apoiar e incentivar grupos profissionais e organizações não-governamentais a estabelecer cuidados especiais sobre assuntos oftalmológicos. Três anos depois, no ano de 1978, foi estabelecido o Programa da OMS de Prevenção de Cegueira e, com ele, foi criada uma base de dados sobre a cegueira no mundo.

No ano de 1979, a OMS divulgou dados globais sobre a cegueira referentes ao ano de 1975, estimando aproximadamente 28 milhões de cegos e 86 milhões de indivíduos com algum tipo de deficiência visual. Esses dados só voltaram a ser atualizados publicamente em 1990, quando o número de pessoas com cegueira foi contabilizado para aproximadamente 38 milhões. Resnikoff e colaboradores afirmaram, em 2004, que existiam em todo o planeta cerca de 37 milhões de pessoas com cegueira e 124 milhões de pessoas com deficiência visual. Em março de 2009 a OMS afirmou que existem cerca de 45 milhões de cegos e 314 milhões de indivíduos com alguma deficiência visual em todo o mundo, porém esse número contabiliza também pacientes com deficiência visual devido a erros refrativos não-corrigidos. Em 2013, a OMS na divulgação do estudo *Universal eye health: a global action plan 2014-2019* atualizou e corrigiu os dados divulgados anteriormente. Os novos valores, com números relativos ao ano de 2010, determinaram que existiam 39 milhões de cegos e 285 milhões de pessoas com alguma deficiência visual.

Na maioria dos casos, os mais afetados são os idosos. Em contrapartida, as mulheres apresentam um risco maior em qualquer faixa etária. Outro ponto relevante levantado pela OMS é que existem cerca de 19 milhões de crianças, com idade abaixo dos 15 anos, com deficiência visual. Desses 19 milhões, cerca de 63% (12 milhões) são portadoras de deficiências visuais reversíveis. A OMS também afirma que aproximadamente 1,5 milhões de menores possuem cegueira irreversível e cerca de 65% deles morrem até dois anos depois de ter perdido a visão.

Países em desenvolvimento possuem entre 80% e 90% dos casos de cegueira no mundo, 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).

Ainda segundo a OMS, as causas mais frequentes 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 frequentes estão a catarata, diabetes, descolamento de retina, glaucoma, retinopatias e causas acidentais.

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).

Atualmente, a OMS fez um levantamento 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 (Resnikoff et al., 2004; OMS, 2013).

Uma projeção baseada em vários estudos, incluindo o de Frick & Foster (2003) e a iniciativa *Vision 2020*, a OMS ressalta que, se não ocorrerem intervenções adicionais imediatamente, até o ano de 2020, o número de casos de cegueira no mundo chegará a alarmantes 76 milhões. 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 a 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 & Kara-José, 2004; Resnikoff et al.2004; Salomão et al., 2009).

1.2.3.2 - Perda visual no Brasil

No Brasil, um estudo no ano 2000, realizado por Kara-José & Arietam, estimou que cerca de 0,5% da população sofre 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 em território nacional brasileiro existiam 150 mil cegos e 16,6 milhões de pessoas com deficiência visual. Outro dado revelado pelo IBGE é que a Região Sudeste, mesmo sendo mais populosa que as outras regiões, ficou em segundo lugar no número de pessoas cegas. Foram 54600 cegos da Região Sudeste contra 57400 cegos da primeira colocada, a região Nordeste. São Paulo apresentou 23900 cegos e foi considerado o estado com o maior número de cegos, seguido pela Bahia, com 15400.

Considerando os dados coletados em 2000 e levando em consideração que nesse mesmo ano a população brasileira era de cerca de 160 milhões de habitantes, surgiu a estimativa de que em 2010, se o número de casos fosse aumentando gradativamente, o total de cegos chegaria a algo em torno de 640.000 no país. Porém, o censo realizado pelo IBGE no mesmo ano (2010) revelou que no Brasil existiam aproximadamente 582 mil pessoas cegas e 12,5 milhões de portadores de deficiências visuais.

No Brasil, a estimativa de prevalência da cegueira sofre variações em termos de diferentes níveis socioeconômicos existentes. Esses casos vão depender da taxa de desenvolvimento das áreas envolvidas. Portanto, é possível estimar que exista uma 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.

1.2.4 - Causas genéticas

Em 1980, François garantiu que mais de 50% de todas as doenças relacionadas à visão eram devidas a um fator genético.

No ano 2000, dados da Academia Americana de Oftalmologia (American Academy of Ophthalmology) indicaram que 90% de doenças médicas podem ter seu desenvolvimento influenciado por um componente genético importante. Doenças oculares como glaucoma, estrabismo, miopia, degeneração macular, catarata e neuropatia óptica possuem fatores genéticos muito evidentes (Orssaud, 2003; Rosemberg, 2003).

Pacientes que possuem doenças relacionadas a fatores genéticos, na maioria dos casos, não apresentam 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).

Analisando as mais variadas manifestações de doenças que causam cegueira de origem genética, várias delas têm relação com a mitocôndria. A atrofia autossômica dominante, que apesar de ter origem em mutações localizadas em um gene nuclear, apresenta suas principais consequências diretamente na ação das mitocôndrias. Por outro lado, a retinite pigmentosa, a catarata congênita e a neuropatia óptica hereditária de Leber são exemplos de doenças causadas por alterações genéticas ocorridas inteiramente no DNA mitocondrial (Guerrero et al., 1998; Simon et al., 1999; Orssaud, 2003).

1.3 - A mitocôndria

Encontradas em todas as células eucarióticas, as mitocôndrias são organelas citoplasmáticas, esféricas e alongadas. São relativamente pequenas, podendo medir de 0,5 a 1 micrometro de largura e até 10 micrometros de comprimento. Porém, são responsáveis pela execução de funções vitais dentro da célula, ou seja, são essenciais para o funcionamento celular. As principais funções mitocondriais são o ciclo do ácido cítrico, a oxidação de ácidos graxos, biossíntese de aminoácidos e, principalmente, a transformação de energia química dos metabólitos citoplasmáticos em energia acessível à célula (Nardin & Johns, 2001).

1.3.1 - Cadeia respiratória mitocondrial

A energia gerada pelas mitocôndrias 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 mitocondrial começa quando, através do ciclo do ácido cítrico, a acetilcoenzima A (acetil-CoA), dos carboidratos e ácidos graxos, é oxidada para dióxido de carbono e água, liberando íons de hidrogênio que reduzem o dinucleotídeo adenina-nicotinamida (NAD) e o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD) para NADH e FADH₂, respectivamente. O NADH e FADH₂ são reoxidados pela cadeia respiratória, com consequente 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 & Johns, 2001; Wallace et al., 1999).

O processo citado acima acontece na membrana mitocondrial interna, que pode ser separada em cinco complexos enzimáticos responsáveis pela OXPHOS, chamados complexos I, II, III, IV e V (Tabela 1).

Tabela 1- Cinco complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial

Complexo Enzimático	Número de Subunidades Nucleares	Quantidade (Subunidades Mitocondriais)
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.

As subunidades pertencentes aos complexos respiratórios são codificadas pelo DNA nuclear, sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos e levadas para as mitocôndrias. A ATP é formada a partir de difosfato de adenosina (ADP) + fosfato inorgânico (Pi) produzida pela energia livre gerada pelo transporte de elétrons pela cadeia respiratória. O complexo I e o complexo II removem os elétrons de NADH e os elétrons do succinato, respectivamente. Os elétrons passam através do complexo III para o citocromo c, em seguida para o complexo IV, e finalmente a água é produzida pelo oxigênio. O processo de transporte de elétrons é tornado uma cadeia respiratória por causa da necessidade de oxigênio. A cadeia transportadora de elétrons libera energia que é usada como bomba de prótons por intermédio da membrana mitocondrial interna. Nesta etapa, é criado um gradiente eletroquímico que é utilizado pelo complexo V como uma fonte de energia potencial para condensar Pi e ADP e fabricar ATP. A membrana mitocondrial interna troca o ATP formado por ADP. Porém, caso necessário o ADP pode ser resintetizado em ATP. (Champe et al., 1997; Junqueira & Carneiro, 1999; Wallace et al., 1999; Nardin & Johns, 2001).

1.3.2 - DNA Mitocondrial

A mitocôndria possui uma característica extremamente importante e totalmente ímpar em relação às outras organelas: a presença de um material genético próprio, conhecido como o DNA Mitocondrial (mtDNA) (Chan, 2006).

O DNA mitocondrial foi descrito pela primeira vez em 1966 por Van Bruggen, Sinclair e Stevens & Nass. Porém, apenas em 1981 foi totalmente sequenciado por Anderson e colaboradores.

O mtDNA é considerado semiautônomo, pois possui um sistema independente de transcrição, tradução e replicação do seu genoma, mas o mecanismo de reparação é dependente do DNA nuclear. Outra característica interessante está ligada ao padrão de herança. O processo de transmissão do material do genético mitocondrial é materno, isto é, o mtDNA é herdado da mãe. Isso acontece porque as mitocôndrias presentes nos

espermatozoides não penetram no óvulo durante a fecundação, pois estão localizadas na região da cauda. Além disso, alguns autores afirmam que existe no óvulo um sistema de destruição de mitocôndrias provenientes dos espermatozoides. Portanto, fica evidente que doenças geradas a partir de alterações no mtDNA são passadas aos descendentes apenas pelas mães (Howell et al., 2000; Carvalho et al., 2002; De Robertis, 2003; Scharfe et al., 2009).

O DNA mitocondrial representa apenas de 1 a 2% de todo DNA encontrado nas células. Ele é responsável por codificar cerca de 10% das proteínas constitutivas das mitocôndrias. Para que haja um bom funcionamento dessas proteínas constitutivas, é necessária uma ótima cooperação entre o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial. O mtDNA possui 16569 pares de bases (pb), organizados de forma circular, que codificam RNAs ribossômicos grandes (16S, MTRNR2), RNAs ribossômicos pequenos (12S, MTRNR1) e 22 RNAs transportadores. Estes RNAs estruturais traduzem 13 polipeptídeos. Essas proteínas codificadas são componentes de suma importância 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 composto por uma dupla fita circular, compacto e sem íntrons (Figura 2). Uma cadeia pesada (H) e outra leve (L) são formadas pela assimetria na distribuição de citosinas e guaninas nas fitas de mtDNA. São 37 genes no mtDNA, sendo 28 deles codificados pela cadeia H e 9 pela cadeia L (Góes, 2003).

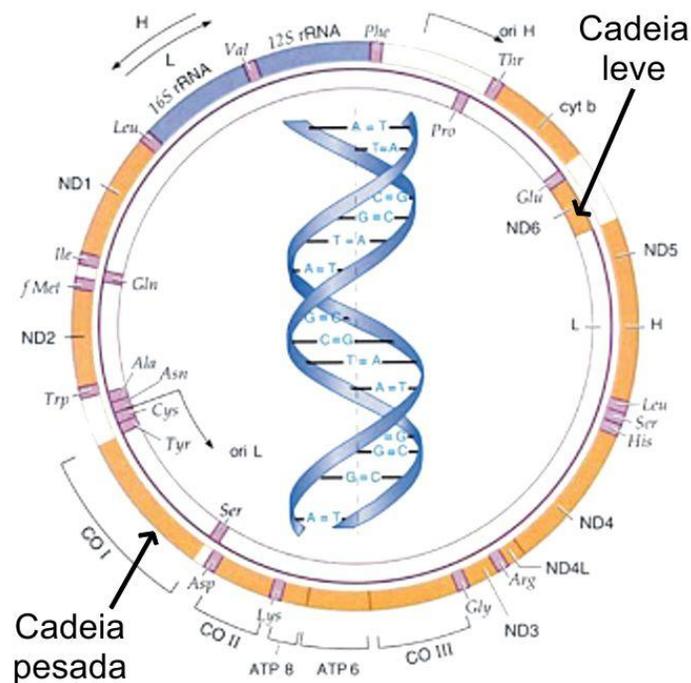


Figura 2 - Esquema da dupla cadeia do DNA mitocondrial, evidenciando a cadeia pesada (H) e cadeia leve (L).
Modificado de http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/ross_lab/variations.cfm&docid

1.3.3 - Homoplasmia *versus* Heteroplasmia

As mitocôndrias, na divisão celular, são distribuídas de forma aleatória para as células-filhas, após se dividirem por fissão simples. Uma propriedade relevante da mitocôndria é a presença de várias cópias de mtDNA dentro de cada célula, característica essa chamada de Poliplasmia. No ano de 1994, Alberts relatou que a quantidade de mitocôndrias tende a variar entre as células, indo de aproximadamente 500 a 10 mil delas por célula. Esse número varia de acordo, principalmente, com o organismo e o tecido em que as células portadoras dessas organelas se encontram. Outro fator que influencia o número de mitocôndrias por célula está diretamente ligado à atividade metabólica e demanda energética de cada região (Voet et al., 2006).

Por existirem em grande número e serem distribuídas aleatoriamente após a divisão, as mitocôndrias podem apresentar uma condição chamada heteroplasmia, que é a presença

de mtDNA mutante e normal simultaneamente dentro de uma mesma célula. Porém a célula normalmente apresenta mitocôndrias com apenas mtDNA normal ou mtDNA mutante. A essa condição se dá o nome de homoplasmia (Carvalho et al., 2002).

Se uma célula contendo mtDNA heteroplásmico se divide o resultado também será aleatório, gerando três condições possíveis:

- 1- Células com mitocôndrias com mtDNA normal e mutante (heteroplasmia);
- 2- Células com mitocôndrias com apenas mtDNA mutante (homoplasmia);
- 3- Células portando somente mitocôndrias com mtDNA normal (homoplasmia).

A maioria das alterações malélicas no mtDNA estão em estado de heteroplasmia. Em contrapartida, os polimorfismos não patogênicos são homoplásmicos (Nardin & Johns, 2001; Carvalho et al., 2002).

1.3.4 - Haplogrupos mitocondriais

O DNA mitocondrial possui uma taxa alta de polimorfismo. Um número de variações não malélicas na sequência do mtDNA se fixaram em diferentes populações durante a evolução humana e foram transmitidos ao longo das gerações. Por ter herança exclusivamente materna e não recombinar, estes polimorfismos acumulados (haplótipos) foram sendo repassados pelas mulheres desde o surgimento da espécie humana até os dias de hoje. Os haplótipos são usados como marcadores moleculares e o conjunto deles, haplogrupos, são utilizados para determinar a origem ancestral mitocondrial de um determinado indivíduo ou população (Cann et al., 1987; Cann, 2001).

Na sua origem, cada grupo populacional pertenceu a um ou mais haplogrupos. Atualmente, são 25 os principais haplogrupos, contendo um total de 497 variáveis polimórficas definidas (Tolk et al., 2001; Herrnstadt et al., 2002; Wallace, 2005; Romero et al., 2014).

Todos os haplogrupos são descendentes de um ancestral em comum que surgiu na África. Esse primeiro haplogrupo específico africano foi chamado de L0 e deu origem a mais três linhagens africanas: L1, L2 e L3 (Figura 3). Ainda na África, L3 deu origem a duas novas linhagens, M e N, que por sua vez deixaram a África e colonizaram toda

Eurásia. O haplogrupo N deu origem aos haplogrupos H, I, J, Uk, T, U, V, W e X na Europa e aos haplogrupos A, B e F na Ásia. Também na Ásia, o haplogrupo M deu origem aos haplogrupos C, D e G. Já os haplogrupos A, C e D se tornaram mais frequentes no nordeste da Sibéria, antes de chegar aos Paleo-Índios. O haplogrupo X chegou à região central do Canadá. O haplogrupo B entrou nas Américas, passando pela Sibéria e pelo Ártico. Tempos depois, um processo migratório trouxe um haplogrupo A modificado do nordeste da Sibéria para o noroeste da América do Norte. Enfim, relativamente recente, derivados dos haplogrupos A e D se moveram do Círculo Polar Ártico para encontrar os esquimós (Torroni & Wallace, 1994; Cann, 2001; Herrnstadt, 2002; Wallace, 2005; Deberneva, 2009; mitomap.org, 2013; Meng et al.,2014).

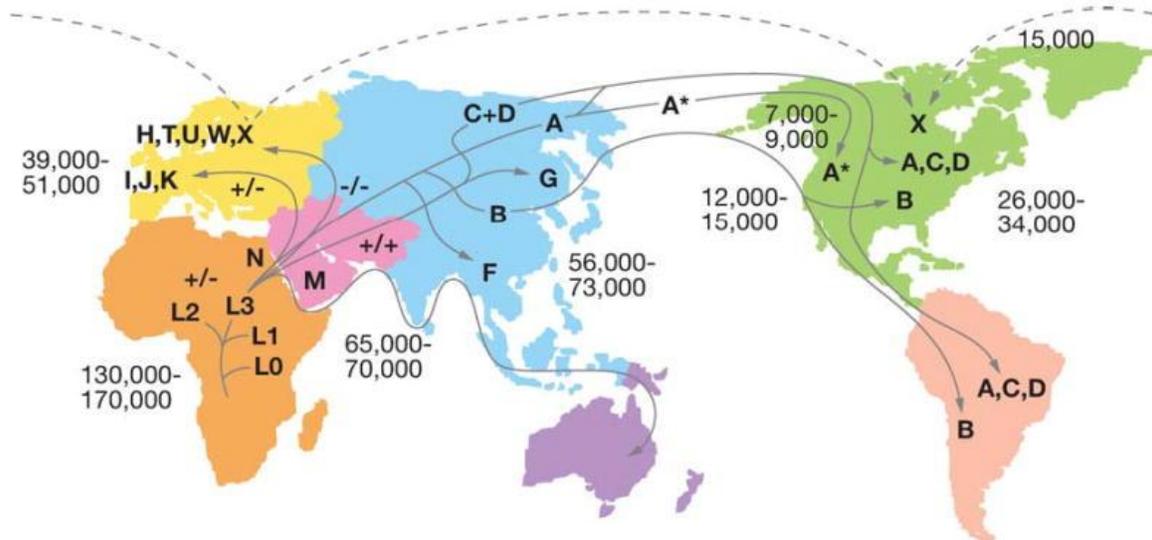


Figura 3 - Diagrama da história migratória dos haplogrupos do mtDNA humano. Números representam os possíveis anos que as alterações começaram a se fixar na população. Modificada de Wallace, 2005

1.3.5 - Mutações no DNA mitocondrial

Como já descrito, o DNA mitocondrial possui alta taxa de mutação. E essas mutações estão divididas em dois grupos que são os rearranjos e as mutações de ponto. Os rearranjos, que geralmente não são passados para as próximas gerações, são subdivididos em deleções (exclusão de nucleotídeo de um determinado locus) e duplicações (adição de

nucleotídeo em um determinado locus). As mutações de ponto, que são herdadas com padrão de herança materno, que consistem em substituição de nucleotídeos e aminoácidos (condição mais rara descrita em algumas doenças neurológicas e oftalmológicas). 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).

A alta taxa de mutações eleva consideravelmente o número de manifestações sistêmicas e neurológicas. São descritas diversas manifestações sistêmicas, dentre elas podem ser citadas: 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: cefaleia vascular, convulsões, demência, depressão, distonia, mioglobinúria recorrente, episódios apoplexiformes, mielopatia, mioclonia, miopatia, nistagmo, oftalmoplegia, ataxia, retinopatia pigmentar, surdez e neuropatias ópticas (Guerrero et al., 1998; Marriage et al., 2003; Scharfe et al., 2009).

De todos os principais fenótipos associados à doenças mitocondriais, com certeza as doenças que ocasionam comprometimento da visão merecem destaque. Esse comprometimento visual ocorre principalmente por disfunções do nervo óptico. As neuropatias ópticas mais comuns encontradas na prática clínica são a neuropatia óptica hereditária de Leber e a atrofia óptica autossômica dominante (Yu-Wai-Man et al, 2009).

1.4 - Neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON)

1.4.1 - Histórico

A atrofia óptica de Leber foi descrita pelo alemão Teodor Leber em 1871. O oftalmologista alemão havia descrito pela primeira vez a doença, após estudar indivíduos de quatro famílias distintas. Leber descreveu a atrofia óptica como uma súbita perda de visão em homens jovens com um histórico familiar de cegueira. Mas também notou que a

transmissão da doença era unicamente materna, que os homens estavam mais expostos aos efeitos que as mulheres e que o acometimento foi quase exclusivamente do nervo óptico (Leber, 1871).

Posteriormente a atrofia óptica de Leber passou a se chamar Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON).

Wallace e colaboradores, em 1988, publicaram a descoberta da primeira mutação de ponto no mtDNA associada à doença humana. Essa mutação foi associada às famílias com quadro clínico da LHON. Desde então, buscando a melhor teoria que explique a patogênese e fatores determinantes para a expressão desta doença, surgiram inúmeras pesquisas relacionadas à clínica, genética e bioquímica da doença (Wallace et al, 1988; Newman, 2002).

Atualmente a LHON é a doença mitocondrial considerada mais frequente 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 & Buttery, 1992; Man et al., 2003; Spruijt et al., 2006; Puomila et al., 2007).

1.4.2 - Sintomas

Atualmente a LHON é descrita como 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; Man et al, 2009; Kodrón et al., 2014).

A LHON afeta geralmente adultos jovens, com uma idade média de início das manifestações entre os 18 e 35 anos, mas a idade dos pacientes pode variar consideravelmente. Os indivíduos afetados são, na maioria dos casos, 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 da 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 aproximadamente 25% dos casos, ou posteriormente, por vezes com um intervalo que pode atingir 9 meses (Orssaud, 2003; Yu-Wai-Man & Chinnery, 2008; Aitullina et al., 2013).

A acuidade visual é severamente reduzida, podendo chegar a valores inferiores a 20/400. Outro sintoma observado é a anomalia que interfere na percepção das cores conhecida como discromatopsia (Biousse & Newman, 2001; Orssaud, 2003; Yu-Wai-Man & Chinnery, 2008). Alguns pacientes podem sentir dor durante a perda da visão, mas na grande maioria dos casos ela é indolor (Huoponen, 2001).

Os homens apresentam perda subaguda ou aguda da visão bilateral quatro vezes mais frequente que as mulheres (Yu-Wai-Man & Chinnery, 2008). O fato de indivíduos do sexo masculino serem mais acometidos que do sexo feminino ainda não foi esclarecido, mas há a hipótese de que as mutações do mtDNA por si só não sejam suficientes para que ocorra a expressão fenotípica da LHON. Esse fato sugere que genes nucleares, localizados no cromossomo X, possam interagir no desenvolvimento da maior incidência dos efeitos da doença em homens (Bu & Rotter 1991; Aitullina et al., 2013).

Segundo Yu-Wai-Man & Chinnery (2008), o diagnóstico da doença pode ser obtido através de exames oftalmológicos. Os principais exames e suas funções são:

- Angiofluoresceinografia - Identificar características e alterações vasculares na fase aguda;
- Perimetria de Goldmann - Rastrear a presença de escotoma central ou escotoma centrocecal característico;
- Estudos eletrofisiológicos - Confirmar a disfunção do nervo óptico e ausência de doenças na retina
- Imagem craniana - Excluir outras causas compressivas, infiltrativas e inflamatórias de neuropatia óptica bilateral;

- Oftalmoscopia ou fundoscopia - Exame do fundo do olho realizado para detectar alterações na retina.

Indivíduos portadores da LHON apresentam nos seus exames oftalmológicos alterações do reflexo pupilar e do campo visual, podendo ocorrer também alterações no fundo do olho, onde a fundoscopia pode revelar 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 & Newman, 2001; Orssaud, 2003).

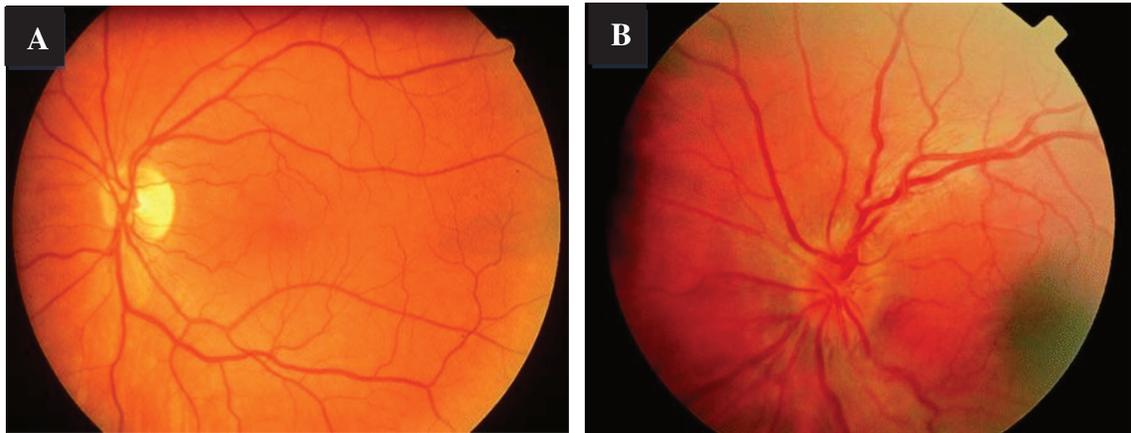


Figura 4 - Exame de Oftalmoscopia mostrando (A) fundo do olho normal e (B) fundo do olho na fase aguda da LHON apresentando palidez, pseudo-edema do disco óptico, hiperemia, dilatação arteriolar e tortuosidade vascular. Retirado e modificado de <http://jmg.bmj.com/content/46/3/145/F1.medium.gif>

1.4.3 - Mutações relacionadas à LHON

As formas mais graves da LHON, segundo alguns autores, apresentam as mutações em homoplasmia. Outra característica interessante é 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).

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

Com o passar dos anos, a quantidade de mutações tem variado consideravelmente. A princípio foram identificadas três mutações principais, que foram denominadas mutações primárias, e quatorze mutações subsequentes, mais raras, chamadas de mutações secundárias (Man, 2002). No ano de 2009, Yu-Wai-Man e colaboradores relataram vinte e uma mutações importantes. No início de 2010, o número de mutações registradas no Banco de Dados Mitomap era de 32. Em todos os casos citados, as mutações sempre estavam divididas em mutações primárias e secundárias. Em meados do ano de 2012, após atualização dos dados do Mitomap, o número de mutações primárias foi aumentado de três para catorze. Após essa atualização, a denominação Mutações Secundárias caiu em desuso. Dezoito mutações, menos frequentes (encontradas em uma única família ou em um único caso) foram definidas como mutações candidatas da LHON (<http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON>).

Das catorze mutações primárias, três delas são consideradas como principais, pois apresentam um maior risco de expressão fenotípica e pelo menos uma delas está presente em 95% dos indivíduos portadores de LHON. As outras onze mutações primárias são consideradas raras e foram relatadas em 5% dos casos. São justamente nessas mutações mais raras, juntamente com as mutações candidatas, que os autores divergem, pois apesar de muitas dessas mutações terem sido descritas, a sua ocorrência é rara, a interpretação das alterações é complexa e os seus mecanismos de ação ainda não foram esclarecidos (Man & Chinnery, 2008; Yu-Wai-Man et al., 2009; Pferffer et al., 2013; Kodrón et al., 2014). A tabela 2 mostra todas as mutações relacionadas à LHON, segundo dados compilados do Banco de Dados Mitomap:

Tabela 2 - Mutações mitocondriais relacionadas à LHON

GENES	MUTAÇÕES		
	PRIMÁRIAS PRINCIPAIS	PRIMÁRIAS RARAS	CANDIDATAS
<i>MT-ND1</i>	G3460A	G3635A G3700A G3733A C4171A	C4025T T4160C
<i>MT-ND2</i>	-	-	C4640A G5244A
<i>MT-ATP6</i>	-	-	T9101C
<i>MT-CO3</i>	-	-	G9804A
<i>MT-ND3</i>	-	-	T10237C
<i>MT-ND4L</i>	-	T10663C	-
<i>MT-ND4</i>	G11778A	-	T11253C A11696G
<i>MT-ND5</i>	-	-	T12811C C12848T G13051A A13637G G13730A
<i>MT-ND6</i>	T14484C	G14459A C14482A C14482G A14495G T14502C C14568T	G14279A T14325C C14498T G14596A
<i>MT-CYB</i>	-	-	G14831A

Dados retirados e compilados em 07 de julho de 2014 de <http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON>

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

1.4.4 - Mutações primárias

1.4.4.1 - Três principais mutações primárias

Das catorze mutações primárias, três delas são principais e estão presentes em 95% dos casos. São elas: G11778A, T14484C e G3460A. Essas mutações estão presentes nos

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 G11778A, que é a causa mais comum de LHON, correspondendo a 69% dos casos. 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).

A mutação G11778A ou Arg340His, troca uma guanina por uma adenina na posição 11778 do mtDNA, o que acarreta na substituição do aminoácido arginina por uma histidina 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).

A forma como 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. 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).

1.4.4.1.2 - Mutação primária T14484C no gene *MT-ND6*

O gene *MT-ND6*, também conhecido como gene mitocondrial NADH desidrogenase subunidade 6, 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).

Mutação menos frequente, dentre as três principais, a G3460A está presente no gene *MT-ND1*. A mutação ocorre em 13% dos pacientes estudados no mundo, número mais uma vez idêntico ao da população finlandesa. Esta mutação é caracterizada pela troca de uma guanina por uma adenina na posição 3460 do mtDNA. Esta mutação tende a causar perda de visão intermediária, se comparadas com as outras mutações primárias, apresentando probabilidades de melhora parcial da visão entre 20% e 25% (Newman et al., 1993; Cock et al., 1999; Huoponen; 2001; Man e Chinnery, 2008; Yu-Wai-Man et al., 2009).

Mas não apenas a mutação G3460A está localizada no gene *MT-ND1*. Pelo menos cinco alterações importantes 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). 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 as outras doenças citadas até então, o mecanismo de ação ainda não foi explicado (Simon et al., 2003).

1.4.4.2 - Mutações primárias raras

Se comparadas às três mutações principais, as mutações primárias raras se apresentam em um número quase três vezes maior. Ao todo são onze mutações primárias raras. Mas apesar de serem numerosas, representam apenas 5% das ocorrências das mutações mitocondriais relacionadas à LHON (Achilli et al, 2012; <http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON> - Acessado 07 de julho 2014).

Mutações primárias raras estão presentes em quase todos os genes descritos como portadores das principais mutações. São eles: o gene *MT-ND1* (G3635A, G3700A, G3733A, C4171A), o gene *MT-ND4L* (T10663C) e o gene *MT-ND6* (G14459A, C14482A, C14482G, T14502C, A14495G e C14568T).

Até o presente momento, os autores não entraram em um consenso sobre a ação dessas mutações no desenvolvimento da doença, ou seja, essas mutações ainda não têm

ainda um papel definido na etiologia da neuropatia. A hipótese mais aceita é de que possam influenciar na progressão da doença ou a de que sejam marcadores polimórficos de diferentes haplogrupos (Nikoskelainen et al., 1996; Yu-Wai-Man et al, 2009; Aitullina et al., 2013; Rezvani et al., 2013). Porém, um estudo realizado por Achilli e colaboradores (2012) sugere que, apesar de raras, essas alterações tenham papel fundamental na ação da doença, assim como as três principais mutações primárias.

1.4.4.3 - Mutações Candidatas

Além das três principais mutações primárias e das mutações primárias raras, a LHON apresenta um grupo de mutações que foram encontradas em casos isolados ou apenas em uma única família. Por não terem sido detectadas em mais casos e não exibirem um mecanismo de ação na expressividade clínica da doença, essas alterações são denominadas Mutações Candidatas. As principais são: C4025T, G5244A, C4640A, T9101C, G9804A, T10237C, T11253C, A11696G, T12811C, C12848T, G13051A, A13637G, G13730A, G14279A, T14325C, C14498T, G14596A e G14831A.

Yu-Wai-Man e colaboradores, em 2009, afirmaram que mutações raras (primárias raras e candidatas) 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 as mutações A11696G e/ou T14596A, T4160C e G14459A, respectivamente, estão associadas a pacientes com LHON e outras alterações clínicas ao mesmo tempo (Jun et al., 1994; De Vries et al., 1996; Gropman et al., 2004; Tarnolsky et al., 2004). Fato esse descrito 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).

1.4.5 - Fatores genéticos mitocondriais

1.4.5.1- Heteroplasmia

A LHON, na maioria das linhagens, apresenta as três mutações primárias principais em estado de homoplasmia. Isso significa que todas as mitocôndrias encontradas nas células dos indivíduos possuem DNA mutante. Em casos onde o estado encontrado seja heteroplásmico, acredita-se que a proporção entre mtDNA mutante e mtDNA normal possa colaborar com a penetrância incompleta. Há também a teoria de que seriam necessários, no mínimo, de 50 a 60% de moléculas de DNA mitocondrial mutadas para haver o risco de cegueira. Como a maioria dos indivíduos com LHON estão em homoplasmia, a proposta de um teste pré-sintomático em indivíduos com mutação para LHON, se mostra desnecessária (Smith et al, 1993; Chinnery et al, 2001)

Estudos comprovam também que em uma mesma família pode haver indivíduos com material genético em estado heteroplásmico e homoplásmico (Mroczek-Tonska et al., 2002; Man et al., 2003)

1.4.5.2- Haplogrupos do DNA mitocondrial - LHON

O risco de perda visual para as três principais mutações primárias pode ser influenciado pelo haplogrupo do DNA mitocondrial, revela um estudo com 159 linhagens europeias da LHON. O haplogrupo J aumentaria o risco de perda visual quando presente em portadores das mutações G11778A e T14484C. Porém, o haplogrupo K adicionaria maior probabilidade de cegueira em indivíduos com a mutação G3460A. Por outro lado, os portadores da mutação G11778A teriam menor risco de perda visual quando possuem o haplogrupo H (Dudkina et al, 2005; Hudson et al, 2007; ; Meng et al.,2014).

Estudos em outras populações analisaram possível relação entre os haplogrupos e as mutações encontradas em portadores da LHON. Em 17 linhagens de chineses portadores da mutação G11778A foram descritos os seguintes haplogrupos: B4a, B5, C, D4, D5, F1, M1, M7b, M8a, M10a e N9a (Qu et al, 2010). O haplogrupo M7b1'2 tende a aumentar o risco de perda visual, enquanto o

haplogrupo M8a tem um efeito protetor, isto é, diminui o risco de perda visual em chineses portadores da mutação G11778A (Ji et al, 2008; ; Romero et al., 2014).

Estudo na população tailandesa mostrou que o haplogrupo B5a1 tem forte associação com pacientes de LHON portadores da mutação G11778A e parece aumentar o risco de perda visual nestes indivíduos, enquanto o haplogrupo F1 poderia ter um efeito protetor (Kaewsutthi, 2011).

Na população iraniana foi verificada associação entre as mutações G11778A e G3460A com os haplogrupos J e W, respectivamente (Shafa et al, 2006).

No Brasil uma grande linhagem de LHON portadora da mutação G11778A, com ancestral materno de origem italiana, pertence ao haplogrupo J (Carelli et al, 2006).

1.5 - Atrofia Óptica Autossômica Dominante (ADOA)

1.5.1 - Histórico

A Atrofia Óptica Autossômica Dominante (ADOA; MIM# 165500), também conhecida como atrofia óptica tipo juvenil, atrofia óptica de Kjer ou OPA1, foi descrita pelo oftalmologista dinamarquês Paul Kjer, em 1959, como uma doença genética caracterizada pela atrofia óptica bilateral progressiva em indivíduos jovens (Kjer, 1959).

Porém existem relatos, da descrição da doença em outros estudos realizados antes dos executados por Paul Kjer. Exemplo disso foi a primeira descrição de atrofia óptica que apresentava diferenças em relação à LHON feita por Snell em 1897 (Snell, 1897).

Em 1958, outro estudo relatou uma atrofia óptica com padrão de herança autossômico dominante e natureza congênita que a distinguia da LHON (Iverson, 1958).

Aproximadamente 13 anos depois, Caldwell e colaboradores (1971) descreveram atrofia óptica na infância em duas famílias distintas, onde não houve consequências neurológicas, congênicas ou anormalidades do desenvolvimento.

Foram descritas, no ano de 1978, famílias apresentando atrofia óptica de início tardio com possível padrão de herança autossômica dominante (Stendhal-Brodin et al.,1978).

Em 1979, foram realizados exames histológicos nos olhos de um paciente do sexo feminino, adulto, portador de atrofia óptica, com características clínicas muito semelhantes à ADOA e que teve sua visão severamente reduzida desde a infância. Foram notadas alterações patológicas na camada de células ganglionares da retina, além de perda de mielina no nervo óptico e no tecido nervoso. Também foi observada a degeneração de células ganglionares da retina. Outro ponto relevante foi que a maioria dos membros afetados da família eram portadores de dificuldades em diferenciar cores (Johnston et al., 1979).

Em meados de 1994, Eiberg e colaboradores descreveram que a atrofia óptica autossômica dominante era caracterizada por um início de atrofia óptica ainda na infância apresentando de moderada a grave diminuição da acuidade visual. Também foi observado escotoma centrocecal de densidade variável e discromatopsia.

Um estudo em 1999 foi realizado comparando dados clínicos de possíveis portadores da doença com os resultados da análise genética. A maior parte dos casos estudados teve sua suspeita clínica confirmada por testes genéticos. A acuidade visual em indivíduos afetados foi altamente variável. Também foi notada palidez do disco óptico e defeitos na visão de cores mínimas. Em metade dos casos os sintomas começaram antes dos 10 anos de idade (Johnston et al., 1999).

Foram estudadas duas famílias com atrofia óptica autossômica dominante nos Estados Unidos. Esse estudo foi importante por apontar ligação com o cromossomo 3q28-q29, variação fenotípica entre as famílias e possível influencia relacionada ao sexo, já que a perda visual entre homens afetados foi mais grave do que entre mulheres (Chen et al., 2000 Skidd et al., 2013).

1.5.2 - Bases clínicas

Atrofia óptica autossômica dominante se apresenta clinicamente como uma neuropatia óptica bilateral. O início da atrofia óptica dominante é insidiosa, os sintomas muitas vezes não são percebidos pelos pacientes em seus estágios iniciais e são apanhados por acaso em exames de rotina olho. Esse início das manifestações da doença é geralmente

entre 4 e 6 anos de idade, mas a ADOA raramente é diagnosticada nessa faixa etária, pois dificilmente causa comprometimento grave da visão na infância. Com o passar dos anos, a evolução da perda visual tende a acelerar drasticamente, principalmente em adultos jovens, causando assim acometimento grave na visão em indivíduos, especialmente, com faixa etária superior aos 20 anos de idade (Orssaud, 2003; Yu-Wai-Man et al., 2010).

Exames na visão revelam escotomas nos campos visuais centrais com preservação da visão periférica, palidez difusa do disco óptico, deficiência de visão de cores e escavação do disco óptico. A progressão da doença pode ser bastante variável, até dentro da mesma família, que vão desde casos leves a mais graves (Skidd et al., 2013; Yu-Wai-Man et al., 2013).

A acuidade visual varia de 20/20 a 20/200 em 85% dos pacientes adultos jovens e é menor que 20/200 nos 15% restantes. Porém, na maioria dos casos, o valor médio da acuidade é de 20/125 (Orssaud, 2003; Yu-Wai-Man et al., 2010).

Alterações características de fundo de olho evidentes no exame são palidez temporal do disco óptico e, em sua fase final, a escavação do disco óptico, como também é visto na LHON e glaucoma de pressão normal (Figura 8).

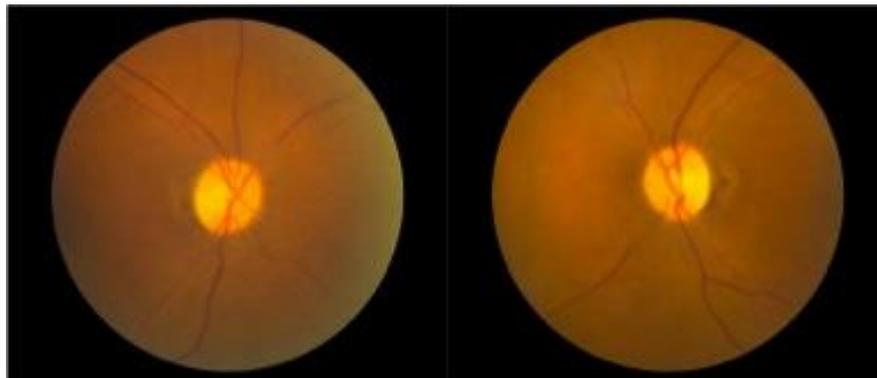


Figura 8 - Fundoscopia mostrando nervo óptico de indivíduo portador da ADOA.

Além disso, outras manifestações clínicas foram associadas à ADOA: perdas auditivas neurossensoriais, oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP), problemas musculares, ataxia e retardo mental (Hoyt, 1980; Votruba et al., 1998; Sallum et al., 2002; Yu-Wai-Man et al., 2010). Mutações no *OPA1* foram confirmadas como causadoras dessas

formas sindrômicas de ADOA, mas geralmente são raras, ocorrendo em famílias isoladas (Amati-Bonneau et al, 2003, 2005;. Shimizu et al, 2003.; Payne et al, 2004;. Liguori, 2008). Foi realizado um estudo multicêntrico de 104 pacientes manifestando ADOA *plus* (ADOA+) para definir o espectro fenotípico e história natural destas complicações neurológicas adicionais. Surdez neurossensorial (bilateral), começando no final da infância e início da idade adulta, foi a manifestação extraocular mais frequente, afetando cerca de 65% dos casos. Outras características clínicas foram desenvolvidas a partir da terceira década de vida em diante; ataxia, miopatia, neuropatia periférica e OECP. Mutações no *OPAI* também foram identificadas em famílias previamente identificadas como tendo paraplegia espástica hereditária autossômica dominante (HSP) (Spinazzi et al, 2008;. Zeviani, 2008; Mackey e Trounce, 2010).

1.5.3 - Herança e incidência

A atrofia óptica autossômica dominante é a forma mais comum de neuropatia óptica hereditária, com uma prevalência entre 1/12000 e 1/50000 (Ferre et al., 2009).

Em países como a Dinamarca, a ADOA afeta 1 a cada 12000 indivíduos (Toomes et al., 2001). Já no norte da Inglaterra a prevalência da doença é 1 em 35.000 indivíduos (Yu-Wai-Man et al., 2010).

A ADOA é herdada de forma autossômica dominante. Ou seja, um paciente heterozigoto para a doença tem 50% chance de transmitir a enfermidade para os filhos (mesmo que seu parceiro não possua a doença).

1.5.4 - Fisiopatologia

A perda de visão em atrofia óptica dominante é devido à perda de fibras do nervo óptico de disfunção mitocondrial. Seis genes cromossômicos são descritos como causando atrofia óptica: *OPAI*, *OPA2*, *OPA3*, *OPA4*, *OPA5* e *OPA6*. A ADOA está diretamente associada à mutações do gene *OPAI* (Delettre et al., 2000).

1.5.4.1 - Gene *OPA1*

Com 29 éxons distribuídos ao longo de 100 kb de DNA genômico, o gene da atrofia óptica 1, também conhecido como gene *OPA1*, está localizado no cromossomo 3q28-q29 (Figura 9). O *OPA1* participa da codificação de uma proteína de 960 aminoácidos que está ancorada à membrana mitocondrial interna, a GTPase. A GTPase codificada por *OPA1* está envolvida em funções relacionados com as manutenções do mtDNA e do potencial de membrana, organização de cristas, com a fosforilação oxidativa e com o controle da apoptose mitocondrial através da compartimentação do citocromo c (Amati-Bonneau et al. 2007; Hudson et al. 2008). Porém, a função mais significativa que a GTPase desempenha é participar da fusão das mitocôndrias, que é de suma importância na organização da rede mitocondrial. A GTPase é expressa em muitos tipos de células e tecidos, incluindo o cérebro, a retina, os músculos esqueléticos, o fígado e o coração (Delettre et al., 2000; Olichon et al., 2006; Yu-Wai-Man et al., 2013).

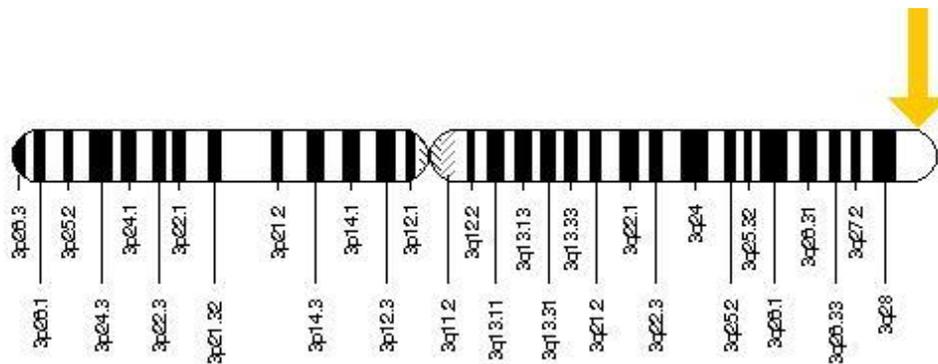


Figura 9 - Esquematização do posicionamento do gene *OPA1* no cromossomo 3. Mais precisamente na posição 29 do braço longo do cromossomo.

1.5.4.2 - Mutações no gene *OPA1*

Alterações no gene *OPA1* podem levar à disfunção global da mitocôndria e consequente colapso das estruturas que transmitem a informação visual dos olhos ao cérebro. Os indivíduos afetados primeiro demonstram perda progressiva das células nervosas da retina, chamados de células ganglionares da retina. Células ganglionares da

retina têm muitas mitocôndrias e uma demanda alta de energia. Por esse fato, alguns pesquisadores acreditam que pode torná-las particularmente vulneráveis à disfunção mitocondrial. Quando as células ganglionares morrem, ocorre degeneração do nervo óptico e gradual interrupção da transmissão normal da informação visual para o cérebro. Não está claro por que as mutações genéticas que causam ADOA afetam preferencialmente os olhos (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Sallum et al., 2002; Amati-Bonneau et al. 2005; Ferre et al., 2009; Yu-Wai-Man et al., 2013).

Mutações no gene são responsáveis por cerca de 60 a 80% dos casos de ADOA. Por isso, diferentes mutações no *OPA1* foram relatadas, incluindo alterações de nucleotídeos de base única dentro das regiões codificantes (44%), variações locais de *splice* (27%) e pequenas deleções de éxons e duplicações (29%). Segundo banco de dados eOPA1, foram descritas mais de 200 mutações patogênicas nesse gene. A maioria destas mutações causa problemas na formação da proteína. A mutação mais comum que causa ADOA é a 2708delTTAG (<http://lbbma.univ-angers.fr/lbbma.php?id=22&type=m> - Acessado em abril 2011). Atualmente, segundo o novo e maior banco de dados sobre ADOA, Mitodyn.org, o número de mutações registradas é de 334 (http://mitodyn.org/home.php?select_db=OPA1 - Acessado 11 de julho de 2014).

Algumas mutações no gene *OPA1*, além de causar a ADOA, pode também afetar outros sistemas do corpo. Um dos efeitos é a condição que causa perda de visão e audição simultaneamente. Outro efeito causado é o surgimento de uma segunda condição mais grave, conhecida como ADOA plus (*ADOA+*). Esta condição implica na perda da visão, fraqueza nos músculos que controlam o movimento dos olhos (oftalmoplegia), dificuldade de equilíbrio e coordenação (ataxia), perda de audição, distúrbios nos nervos usados para o movimento muscular e sensação (motor e neuropatia sensorial) e fraqueza muscular (miopatia). Na maioria dos casos, estas duas condições são causadas pela mesma mutação. Esta mutação conhecida como R445H (Arg445His ou c.1334G>A) substitui uma arginina por uma histidina na posição 445 na proteína GTPase. Ainda não está claro como a mutação R445H age em todas essas condições (Sallum et al., 2002; Amati-Bonneau et al. 2005; Ferre et al., 2009; Yu-Wai-Man et al., 2013).

A ADOA possui expressividade variável, porém a penetrância é relativamente alta, seguindo o padrão monogênico autossômico dominante (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000; Sallum et al., 2002; Amati-Bonneau et al. 2005; Ferre et al., 2009).

Alterações em três formas de atrofia óptica hereditária, para quais as bases moleculares são conhecidos, envolvem o mtDNA, como no LHON, ou genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais, como atrofias ópticas OPA1 e OPA3. Isso indica que alterações das funções mitocondriais desempenham um papel essencial na patogênese da neuropatia óptica (Chevrollier et al., 2008; Yu-Wai-Man et al., 2010; Skidd et al., 2013; Yu-Wai-Man et al., 2013).

1.6 - LHON *versus* ADOA

Embora os mecanismos moleculares precisos envolvidos no desenvolvimento das atrofias ópticas hereditárias ainda não são bem compreendidos, foi demonstrado recentemente que ADOA e LHON possuem um defeito comum de acoplamento da fosforilação oxidativa. Nesses dois casos, a hipótese é de que as mutações no mtDNA e no gene *OPA1* afetariam a integridade mitocondrial, resultando em uma diminuição do fornecimento de energia para os neurônios do nervo óptico. Por sua vez, essa alteração nessa região resultaria na morte das células do nervo óptico, conseqüentemente causando a perda visual (Alexander et al., 2000; Chevrollier et al., 2008).

Antigamente, por terem inicialmente sintomas clínicos bastante semelhantes, principalmente quando o histórico familiar era desconhecido, LHON e ADOA causavam confusão no diagnóstico inicial aos profissionais mais desatentos. Por tantas semelhanças, inclusive no mecanismo de ação da doença, alguns autores acreditavam que possivelmente a penetrância incompleta da LHON pudesse ser influenciada por alterações no gene *OPA1*. Mas essa teoria foi descartada no estudo realizado por Hudson e colaboradores (2010).

1.6.1 - LHON e a ADOA no Brasil: Estudos moleculares

Até o presente momento, poucos estudos moleculares relacionados à LHON e a ADOA foram realizados na população brasileira.

Os primeiros estudos moleculares da LHON com indivíduos brasileiros foram feitos por um grupo de pesquisadores formado por italianos, brasileiros e americanos com 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). No que se refere à frequência relativa das mutações primárias da LHON na população brasileira, apenas dois estudos foram realizados. Em 2010, Maciel-Guerra e colaboradores analisaram um grupo de pacientes com quadro clínico característico de LHON e determinaram que a frequência de portadores de mutações primárias foi de aproximadamente 77%, ou seja, menor que os 95% descritos em outras partes do mundo, mas próxima aos 73,2% encontrados nas populações asiáticas. Já no que diz respeito à frequência de cada mutação primária em particular, a mutação G11778A estava presente em 60% dos casos, a T14484C em 30% e a G3460 em 10%, diferindo da média das frequências encontradas em outras partes do mundo. Em um estudo mais recente, foram analisados 26 indivíduos com o diagnóstico clínico de LHON, sendo encontrados dentre eles dois casos com a mutação G11778A e dois com a mutação T14484C. Porém, nesse mesmo estudo, não foram detectados portadores da mutação G3460A ou de qualquer uma das 14 mutações raras estudadas (Amaral-Fernandes, 2010). Apesar dos estudos citados acima, não existem informações sobre a presença das mutações raras da LHON em nosso meio.

No caso da ADOA, as informações sobre estudos moleculares ou de frequência de mutações na população brasileira são totalmente escassas. Não foram encontrados nos principais bancos de dados informações sobre pesquisas no Brasil. Por isso, estudos sobre o tema se fazem necessários com amostras de indivíduos brasileiros.

Como o Brasil é um país que possui uma composição étnica heterogênea, é possível que as frequências das mutações da LHON e da ADOA encontradas no seu território sejam

diferentes em relação as já documentadas na nossa própria população e em outras partes do mundo.

Além disso, a análise molecular das mutações da LHON, assim como da ADOA, 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 ou da ADOA.

Por fim, o estudo das mutações e haplogrupos mitocondriais relacionados à LHON e o rastreamento de alterações no gene nuclear *OPA1* podem ser úteis também no prognóstico de cada paciente, pois a expressão fenotípica da LHON e ADOA pode variar de acordo com os diferentes *backgrounds* genéticos nos indivíduos da nossa população.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Rastrear alterações mitocondriais relacionados à Neuropatia Óptica Hereditária de Leber e detectar mutações da Atrofia Óptica Autossômica Dominante em pacientes brasileiros com hipótese diagnóstica de Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON) e Neuropatia Óptica de Etiologia a Esclarecer.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I - Rastrear e definir a frequência das principais mutações da LHON: G11778A, T14484C e G3460A;

II - Detectar 21 mutações raras da LHON:

- Primárias raras G3635A, G3700A, G3733A, C4171A, T10663C, G14459A, C14482A, C14482G, A14495G, T14502C e C14568T;
- Mutações candidatas C4025T, T4160C, T11253C, A11696G, A13637G, G13730A, G14831A, C14898T, G14596A e G15257A;

III - Otimizar o método de PCR Multiplex Alelo-Específico para detecção das três principais mutações primárias da LHON;

IV - Padronizar a plataforma de genotipagem *TaqMan® OpenArray® Genotyping* para o rastreamento das três principais mutações primárias da LHON;

V - Padronização da plataforma Espectrometria de Massa *iPLEX Gold/Maldi TOF MS* (Sequenom Inc.-San Diego, CA):

- Rastreamento de onze mutações primárias;
- Definição dos haplogrupos mitocondriais;

VI - Determinar a sensibilidade da plataforma *iPLEX Gold/Maldi TOF MS* (Sequenom Inc.- San Diego, CA) para a detecção de baixas taxas de heteroplasmia;

VII - Verificar a presença de mutações nos 10 principais éxons do gene nuclear *OPA1*.

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).

Cento e um (101) pacientes com suspeita de neuropatia óptica foram avaliados no ambulatório de neuroftalmologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP/ Departamento de Otorrino-Oftalmologia. Dentre eles, 67 apresentaram diagnóstico clínico da LHON e 34 foram diagnosticados com Neuropatia Óptica de Etiologia a Esclarecer. Todos eles foram informados a respeito dos objetivos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Informado, fundamentado na Declaração de Helsink e nas diretrizes para coleta de amostras de Doença Genética Humana (*National 863-Plan*) e pelo Comitê de Ética em pesquisa da FCM-UNICAMP.

Os principais critérios de inclusão e exclusão dos pacientes foram:

- Critérios de inclusão: pacientes com diagnóstico prévio de neuropatia óptica, com perda visual indolor e bilateral, aguda ou subaguda, acuidade visual menor ou igual a 20/50 para longe e menor ou igual a J3 para perto, discromatopsia e escotoma central ou cecocentral.

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

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 e ter no máximo 30 anos de idade quando apresentou a doença. Nesses pacientes, as primeiras manifestações clínicas variaram de 14 a 30 anos, ocorrendo em

média aproximada de 25 anos de idade. O tempo médio entre o início e o fim da perda visual bilateral foi de um a quatro meses.

Os pacientes com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer foram aqueles que apresentaram exames clínicos, laboratoriais e de neuroimagem que não permitiram fechar o diagnóstico definitivo. Eles tinham características de evolução clínica e/ou de achados oftalmológicos não típicos de LHON e recorrência familiar de neuropatia óptica com padrão de herança materno. E também características clínicas da ADOA.

Além dos grupos citados acima, foram selecionados 100 indivíduos para formar o Grupo Controle Negativo. Os indivíduos desse grupo foram escolhidos no banco de DNA relacionado à surdez do Laboratório Genética Molecular Humana do CBMEG (UNICAMP), obedecendo à condição de serem maiores de 18 anos de idade, não apresentarem mutações relacionadas à surdez e não possuírem histórico de LHON, neuropatias ópticas atípicas ou qualquer tipo de perda visual.

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. A estratégia principal de rastreamento molecular está compilada na figura 10.

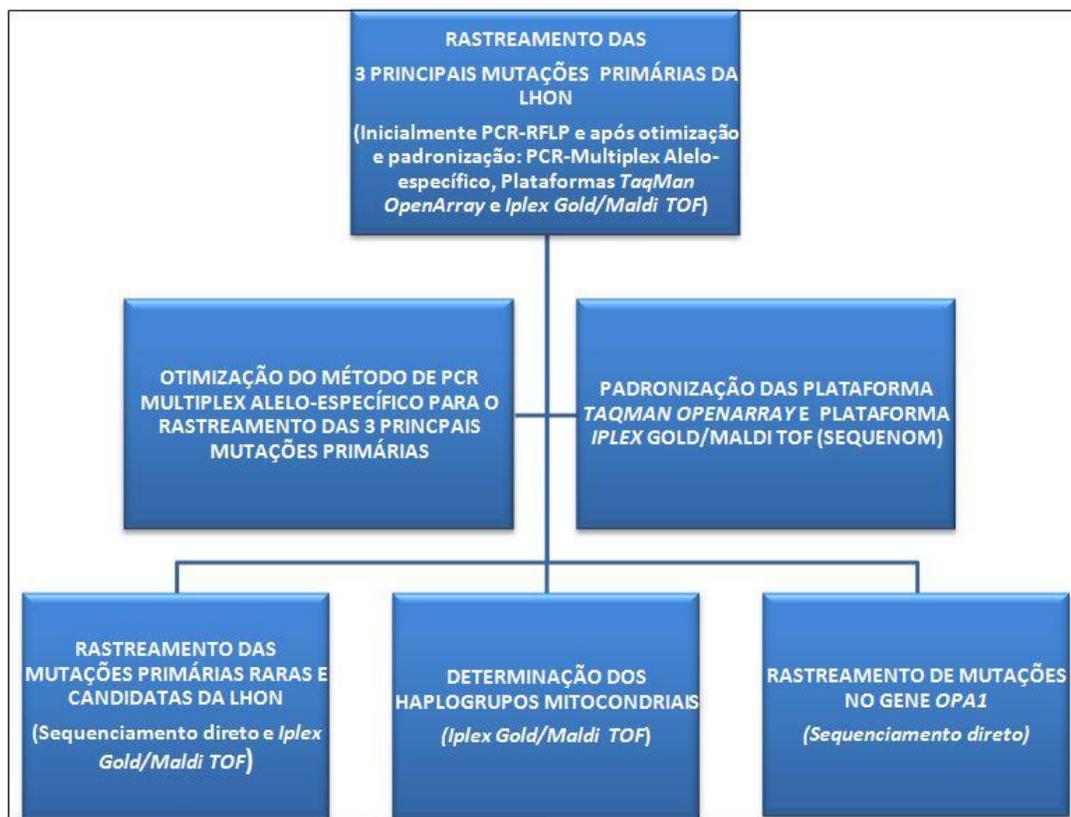


Figura 10 - Esquema da estratégia principal dos testes moleculares realizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG no rastreamento das principais alterações relacionados à LHON e à ADOA.

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.2H₂O) 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%; MgCl₂ 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 2000rpm por 15 minutos a 4°C. Depois dos 15 minutos o sobrenadante foi descartado e o precipitado (*pellet*) foi ressuspensão em

35mL de Solução A. Esta última operação foi repetida por três vezes, até a obtenção de um pellet branco, livre de hemácias lisadas. Tal pellet foi então ressuspense em 1mL da solução B 1X (Na₂EDTA 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. Foi homogeneizada a mistura por inversão lenta do tubo durante 5 minutos. Para separação e recuperação da fase aquosa (sobrenadante) o tubo foi centrifugado a 2.500rpm 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 volumes 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 ressuspendido em volume que de 200mL de TE 1x.

A verificação da qualidade do DNA genômico extraído foi realizada a partir da realização de eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1x,(Tris-Borato-EDTA - TBE 10X é composto de Tris 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. O gel foi corado em solução diluída de Brometo de Etídio (0,5mL/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 Principais

O rastreamento das três principais mutações da LHON foi feito por PCR-RFLP (Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição).

3.2.2.1 - Mutação G11778A no gene *MT-ND4*

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

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

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

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 MgCl₂ (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 11 (Zeviani et al. 1991; Santorelli et al.1997).

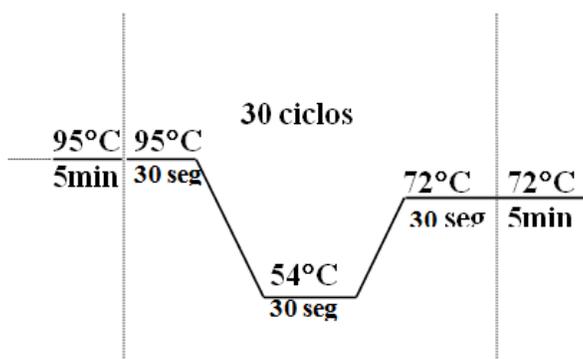


Figura 11 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G11778A.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 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 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 *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 sequência normal teria que apresentar as bandas dos fragmentos de 17 e 32pb, ao passo que na mutante seria perdido um sítio de *Sfa*N I apresentando um fragmento de 49pb. O gel foi corado com brometo de etídeo 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 mostrados 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 (pb)
T14484Ca	GTA GTA TAT CCA AAG ATA ACC A	22
T14484Cb	CTT CTA AGC CTT CTC CTA	18

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 MgCl₂ (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

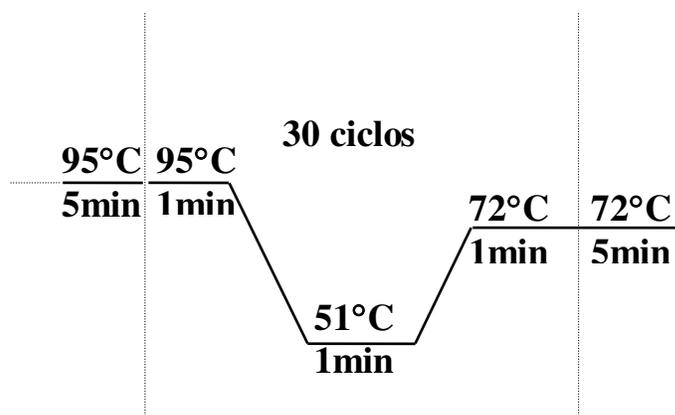


Figura 12 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação T14484A

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% (metade agarose comum e metade agarose 1000) em tampão TBE 1X. A sequência normal apresenta as bandas dos fragmentos de 19 e 135pb, ao passo que na mutante perde-se um sítio de *BsaBI* apresentando um fragmento de 154pb. O gel foi corado com brometo de etídeo 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 são mostrados na tabela 5.

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

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

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 MgCl₂ (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 13:

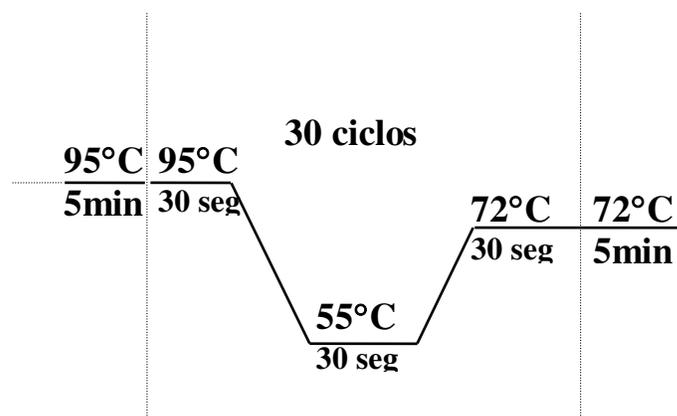


Figura 13 - Ciclos de amplificação do fragmento para estudo da mutação G3460A.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% posteriormente corado com brometo de etídeo. O gel é constituído de 100mL de tampão TBE (Tris, Ác. Bórico, EDTA) e 1.5g de agarose. 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 e 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 sequência 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 de mutações primárias raras e mutações candidatas da LHON

Foram selecionadas 21 mutações raras da LHON seguindo indicações do Banco de Dados Mitomap durante os três primeiros anos da elaboração do presente trabalho. Dessas mutações selecionadas, 11 delas são consideradas mutações primárias raras e 10 são descritas como mutações candidatas (Tabela 6).

Tabela 6 - Mutações primárias raras e mutações candidatas rastreadas no estudo

Mutações Primárias Raras					
G3635A	G3700A	G3733A	C4171A	T10663C	G14459A
C14482A	C14482G	A14495G	T14502C	C14568T	
Mutações Candidatas					
C4025T	T4160C	T11253C	A11696G	A13637G	
G13730A	G14831A	C14898T	G14596A	G15257A	

Para o rastreamento dessas 21 mutações, foram rastreadas 7 regiões que tiveram seus fragmentos amplificados e sequenciados. O sequenciamento 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 principais, mudando apenas os *primers* e as temperaturas dos ciclos (Tabela 7).

Tabela 7 - Mutações primárias raras e candidatas e seus respectivos *primers*.

Região	Mutações rastreadas	<i>Primers</i> (5'-3')	TM*
1	G3635A, G3700A, G3733A, C4025T, T4160C e C4171A	F - CCT AGG CCT CCT ATT TAT TC	53,3°C
		R - GAT TGT AAT GGG TAT GGA GAC	
2	T11253C	F - CGC AGG CAC ATA CTT CC	53,3°C
		R - GAT AGT TCT TGG GCA GTG AG	
3	G11696A	F - CTC TTC AAT CAG CCA CAT AGC	55,7°C
		R - CAT CAA AAA GCT ATT AGT GGG	
4	T10663C	F - GCT ACT CTC ATA ACC CTC AAC	52°C
		R - GCA TTG GAG TAG GTT TAG G	
5	A13637G e G13730A	F - GTC AAC CTC GCT TCC C	51,4°C
		R - GAG TTT TAG GTA GAG GGG G	
6	G14459A, C14482A, C14482G, A14495G, T14502C, G14831A, C14898T, C14568T, G14596A	F - CAC CAA GAC CTC AAC CC	51,4°C
		R - GTA TGC TTT GTT TCT GTT GAG	
7	G15257A	F - CTT ACT ATC CGC CAT CCC	54,0°C
		R - GGG CAA GAT GAA GTG AAA G	

* - TM - Temperatura média de anelamento dos *primers*

F- Forward

R - Reverse

3.2.3.2. Sequenciamento automático

Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados utilizando 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* (GIBCO) para posterior sequenciamento.

Reação de sequenciamento automático para produto de PCR

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

40-80ng de DNA

2 μ L do *mix BigDye*

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

H₂O deionizada para completar 10 μ L

A reação de sequenciamento consistiu de 30 ciclos nas condições especificadas na Figura 14.

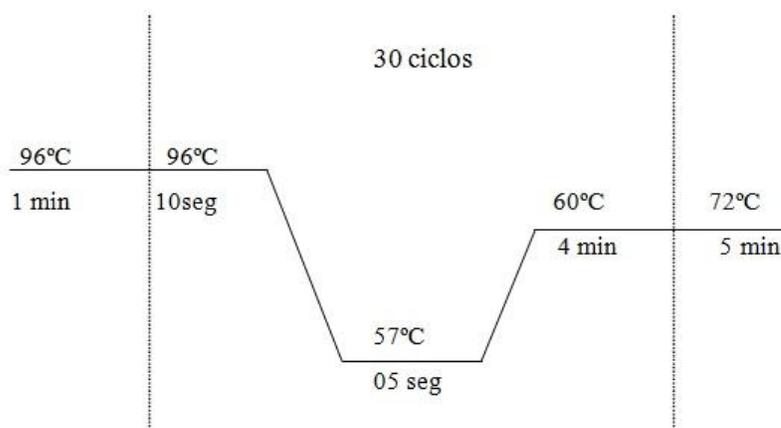


Figura 14 - Ciclos utilizados no sequenciamento.

As reações de sequenciamento prontas foram purificadas e liofilizadas de acordo com as seguintes etapas:

- foram adicionados 80 μ L 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 sequenciador, as seguintes etapas foram seguidas:

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

3.2.3.3 Análise das sequências obtidas

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

3.2.4 - Otimização do método de PCR Multiplex Alelo-Específico para detecção das três principais mutações primárias

O PCR multiplex alelo-específico, descrito por Bi e colaboradores (2010), é um teste diagnóstico que envolve o rastreamento das três principais mutações primárias da LHON simultaneamente em uma mesma reação de PCR. Essa reação tem como base um conjunto de quatro pares de *primers* que amplifica quatro fragmentos diferentes: 359pb, 462pb, 808pb e 664pb referentes à, respectivamente, mutação G11778A, mutação T14484C, mutação G3460A e controle da reação (Tabela 8).

Tabela 8 - Primers do método de PCR Multiplex Alelo-Específico usado no rastreamento das mutações primárias da LHON.

Mutação	Gene	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento
G11778A	MT-ND4	L11760*	ACGAACGCACTCACAcTCA	359pb
		H12118	GATGTCGGGGTTGAGGGAT	
T14484C	MT-ND6	14484-2 *	GTATATCCAAAGACAACgAC	442pb
		H14906	TGAGGCGTCTGGTGAGTAGTG	
G3460A	MT-ND1	3460-2L *	TACTACAACCCTTCGCTGcCA	808pb
		H4227	ATGCTGGAGATTGTAATGGGT	
Controle da reação	MT-RNR1	L1156	GAACACTACGAGCCACAGC	664pb
	MT-TV MT-RNR2	H1782	TCATCTTTCCTTGCGGTAC	

* A extremidade 3' do *primer* mutante-específico é a base mutante e está sublinhado. Incompatibilidade adicional na 3ª ou 4ª base da extremidade 3' é destacada em letras minúsculas e negrito.

No estudo de Bi e colaboradores (2010), as reações de PCR foram realizadas em um volume total de 20µl, contendo: Tampão de PCR (1,5 mmol/l de MgCl₂), 0,5 unidades de *TaKaRa rTaq* (Takara Bio Inc., Dalian, China), 175 mmol/l de cada dNTP, 0,15 µmol/l de cada *primer* das mutações (G11778A, T14484C e G3460A), 0,05 µmol/l do *primer* de controle de reação e 50ng do DNA a ser estudado. A PCR foi realizada com os seguintes procedimentos: um ciclo de pré-desnaturação de 5 minutos a uma temperatura de 94 °C; 30 ciclos de amplificação de 94 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 35 segundos; e um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72 °C durante 7 min. O resultado da reação e o padrão de bandas gerado podem ser visualizados em gel de agarose 1,5% (Figura 15).

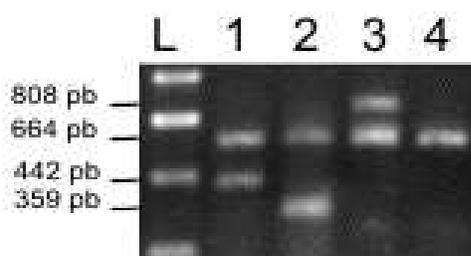


Figura 15 - Padrão de bandas da PCR multiplex Alelo-Específico para o rastreamento das mutações primárias da LHON, modificado de Bi et al, 2010. (L) *Ladder 2000 DNA Marker*. (1) Controle positivo T14484C; (2) Controle positivo G11778A; (3) Controle positivo G3460A; (4) Controle negativo.

No presente estudo, as modificações do método foram direcionadas primeiramente ao aproveitamento de reagentes e equipamentos utilizados no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG - UNICAMP. O equipamento selecionado para todos os testes foi o termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler - Life Technologies*. Os reagentes básicos usados foram: tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8), MgCl₂ (50mM), dNTP Set (100 mM) e *Taq DNA Polymerase (Brasil)*, todos da *Invitrogen™ (Life Technologies)*. Os *primers* sintetizados foram os mesmos citados na tabela estudo original (tabela 8). Além disso, foram feitos testes usando os reagentes adjuvantes BSA (*Bovine Serum Albumin 5mg - Thermo Scientific*) e DMSO (*Dimethyl sulfoxide PCR Reagent - Sigma Aldrich*). E também foram realizadas alterações visando modificar condições do ciclo de amplificação (temperatura, tempo e número de ciclos) e reduzir volumes e concentrações dos reagentes utilizados na reação.

3.2.5 - Padronização da plataforma TAQMAN® OPENARRAY™ genotyping

3.2.5.1 - Preparação das amostras

Antes do início da utilização da plataforma *TaqMan® OpenArray® Genotyping* é necessário seguir cinco passos principais: escolha das alterações/mutações a serem estudadas, desenho e síntese dos ensaios, análise de concentração e pureza, diluição das amostras e realização real do experimento.

3.2.5.2 - Desenho e Síntese dos ensaios

As mutações G11778A, T14484C e G3460A foram inseridas dentro do *layout* de 32 ensaios / 96 amostras para as placas de *OpenArray™*. Foram selecionadas as três sequências onde se encontravam as alterações estudadas. Estas foram analisadas no site “*Repeat Masker*” (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>), do *Institute*

for Systems Biology, para verificar se as sequências eram repetitivas em outras partes do mesmo genoma ou em outro genomas (mascaramento das sequências).

Após o mascaramento, foi verificado que nenhuma das sequências, que continham de 281 a 626pb, mostrou ser repetitiva. Para enviar as sequências para a customização, foram adicionadas as alterações alélicas a serem estudadas, todas entre colchetes precisamente no local da variação (Tabela 9). A representação das alterações alélicas a serem enviadas obedece ao padrão $[X/Y]$, onde o X representa a base da sequência normal e o Y à troca.

Tabela 9 - Principais mutações primárias da LHON e suas sequências.

Mutação	Alteração	Sequência usada
G11778A	[G/A]	TGCCTAGCAAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTC[G/A]CATC ATAATCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCTCTACTCCC
T14484C	[T/C]	TCCTCAATAGCCATCGCTGTAGTATATCCAAAGACAACCA[T/C]CA TTCCCCCTAAATAAATTAATAAAAACTATTAAACCCATATAACCTCCC CCAAAATTTCAGAATAATAACACACCCG
G3460A	[G/A]	CCCCTACGGGCTACTACAACCCTTCGCTGAC[G/A]CCATAAAACTC TTCACCAAAGAGCCCTAAAACCCGCCACATCTACCATC

As sequências foram inseridas no *software Custom TaqMan[®] Genomic Assays - File Builder Version 3.1* (Applied BioSystems), no qual foi gerado um arquivo na extensão ‘.txt’ contendo todos os dados dos ensaios. Posteriormente, este arquivo foi enviado para a Applied BioSystems via e-mail com as demais descrições do ensaio para a customização das placas de *OpenArray[™]*.

Foram elaborados os ensaios contendo um par de *primers* em comum e duas sondas, uma contendo a sequência normal, sendo marcada com o fluoróforo *VIC[®]* e outra contendo a sequência mutante, juntamente com o fluoróforo *FAM[®]* (Tabela 10).

Tabela 10 - Sequência dos *primers* e sondas utilizados para genotipagem na Plataforma *TaqMan® OpenArray®* .

Assay	Primer (5' - 3')		Sondas	
	Forward	Reverse	VIC®	FAM®
G11778A	TGC CTA GCA AAC TCA AAC TAC GAA	GGG AGT AGA GTT TGA AGT CCT TGA G	ACTCACAGTCGCAT CAT	CTCACAGTCACA TCAT
T14484C	TCC TCA ATA GCC ATC GCT GTA GTA T	CGG GTG TGT TAT TAT TCT GAA TTT TGG G	ACAACCATCATTCC C	AACCACCATTCC C
G3460A	CCC CTA CGG GCT ACT ACA AC	GAT GGT AGA TGT GGC GGG TTT	CTTCGCTGACGCCA TAA	CTTCGCTGACAC CATAA

3.2.5.3 - Concentração, pureza e diluição das amostras

A integridade, a quantificação correta e a pureza das amostras estão diretamente ligadas ao bom rendimento da Plataforma, por isso essas três etapas são de fundamental importância.

Tanto a visualização da pureza quanto a quantificação foram feitas em triplicata, utilizando a média dos três resultados como o valor a ser considerado para os cálculos nas diluições. Para isso, utilizou-se o *NanoDrop® 8000* (Thermo Scientific) para verificação de pureza e o *Qubit® 2.0 Fluorometer* para obter a concentração das amostras.

Para a verificação da pureza através do *Nanodrop® 8000*, foi feita a limpeza dos *slots* do *Nanodrop® 8000* com 2µL de água ultrapura e a leitura do branco no equipamento utilizando 2µL de TE 1X por *slot*. Foram usados 2µL de cada amostra para a verificação da pureza (em triplicata). Para uma ótima pureza, os valores da razão $A_{260/280}$ deveriam estar entre 1,8 e 2,0, podendo se considerar amostras com valor de 1,7.

Para a análise da concentração das amostras, foi utilizado *Qubit® 2.0 Fluoremeter*. As amostras foram homogeneizadas utilizando um vórtex e 1µL de cada foi transferida, em triplicata, para tubos de 0,5µL da *Axygen® PCR-05-C* (VWR, part no. 10011-830). Em seguida, foi adicionado 199µL de *Working Solution* do *Qubit® Assay Kit dsDNA Broad Range Assay* (Invitrogen). Esta solução (*Working Solution*) é composta de uma diluição de 1:200 do reagente *Qubit®* no tampão *Qubit®*, ambos presentes no *kit*. Além das amostras, foram feitos 2 controles padrões (um contendo a menor concentração e outro contendo a maior concentração de solução Padrão detectada pelo aparelho). Após esta etapa, os tubos

foram homogeneizados e incubados por 2 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz direta. Para a quantificação das amostras, foram determinados os valores dos padrões e em seguida foi realizada a leitura de cada uma das amostras em triplicatas. Os valores da concentração ($deng/\mu L$) foram obtidos calculados pelo próprio *Qubit*[®] 2.0 *Fluoremeter*.

As amostras foram submetidas à diluições para que chegassem à concentração final de $50ng/\mu L$, em um total de $20\mu L$ de volume. Para cálculos, foi utilizada a fórmula: $C_1.V_1=C_2.V_2$. Após os cálculos, as amostras foram individualmente diluídas com TE 1X em tubos de $0,2\mu L$ da empresa Axygen[®] PCR-02-C.

3.2.5.4 - Genotipagem com a plataforma *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] *Genotyping*

Foram misturados $2\mu L$ da amostra devidamente diluída e $2\mu L$ do *TaqMan*[®] *OpenArray*[®] *Master Mix* em cada poço de uma placa de 384 poços. Em seguida, a placa foi selada com o adesivo de selagem da Thermo Scientific[®] para evitar evaporação da mistura *Amostra/Master Mix*.

Um robô pipetador, o *OpenArray*[™] *AccuFill*[®] *System* (Applied Biosystems), foi utilizado para transferir as amostras contidas nas placas de 384 poços para a placa de *OpenArray*[™]. Todas as operações foram coordenadas com o uso do *software OpenArray*[™] *AccuFill*[®], presente em um computador interligado ao aparelho.

As placas de *OpenArray*[™] precisaram ser inserida em *cases* de vidro. As *cases* foram preenchidas com líquido de imersão suficiente para cobrir as placas. O líquido de imersão serve para estabilizar as reações nas placas (criando condições ideais para a reação de amplificação, ligação e clivagem das sondas). Após a inserção das placas nas *cases*, foi realizada a etapa de selagem. A selagem consiste na adição de goma fotossensível na extremidade aberta da *case*, por onde entrou a placa. As *cases* já parcialmente seladas pela goma (*case* + placa + goma = *slide*) foi colocada por 2 minutos, sob ação de luz ultravioleta, na estação de selagem. Esta etapa tem a função de solidificar a goma e selar de forma definitiva o *slide*.

Os *slides* foram levados ao termociclador Dual Flat Block GeneAmp[®] PCR System 9700 da Applied BioSystems. A termociclagem dos *slides* eram formados por 50 ciclos a

95°C por 45 segundos para a desnaturação do DNA, seguido da temperatura de 94°C por 13 segundos para o anelamento dos *primers* e das sondas. Por último houve a queda da temperatura para 53°C por 2 minutos e 14 segundos, ocorrendo a extensão das novas fitas e a hidrólise das sondas *TaqMan*[®]. O tempo médio total foi de quatro horas e dez minutos.

Após a termociclagem, foi realizada a obtenção dos resultados. Para isso, foi necessário capturar a fluorescência das sondas hidrolisadas, sendo utilizado o equipamento *OpenArray*[™] *NT Cycler* (*Biotrove, Inc.*). Essa captura é coordenado pelo *software OpenArray*[™] *SNP Genotyping Analysis* (*Applied BioSystems*) instalado no computador interligado. Todo o processo é realizado em 15 minutos, com o auxílio de um conjunto de câmeras CCD (*Charge-coupled Device*) posicionadas no interior do *Cycler*. Após as câmeras CCD capturar a fluorescência emitida nos ensaios, estas foram transformadas em números. Estes números foram formados de acordo com o comprimento de onda gerados pelas fluorescências emitidas, variando de acordo com a sonda detectado presente, *VIC*[®] ou *FAM*[®], e sua intensidade. No *software*, estes números são convertidos em novos valores e em *clusters*. São três *clusters* diferentes:

1 - *Cluster* de cor vermelho: Presença da sonda repórter *VIC*[®] - Associado aos indivíduos homozigotos/homoplásmicos normais;

2 - *Cluster* de cor azul: Presença da sonda *FAM*[®] - Representa os indivíduos com homozigotos/homoplásmicos mutantes;

3 - *Cluster* de cor verde: Presença sondas *VIC*[®] e *FAM*[®] no mesmo indivíduo - Indica a presença indivíduos heterozigotos/heteroplásmico, ou seja, que apresentam material genético mutante e normal, anelando e hidrolisando ambas as sondas.

A figura 16, exemplifica o padrão encontrado nos 3 *clusters*:

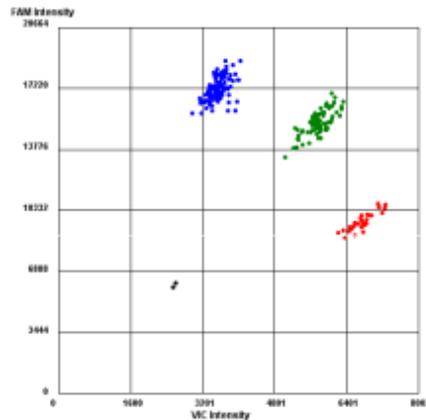


Figura 16. Imagem gerada pelo software *OpenArray™ SNP Genotyping Analysis* exemplificando o padrão básico dos três *clusters*. Em azul, indivíduos mutantes. Em vermelho indivíduos normais. E em verde, heterozigotos/heteroplásmicos.

Os arquivos gerados pelo *OpenArray™ NT Cycler* foram salvos e exportados para outro *software*, também da Applied BioSystems: o *TaqMan® Genotyper*. O *Genotyper* obedecia aos mesmos padrões de visualização dos *clusters*, porém apresentava mais ferramentas e melhores opções para análise.

Após as análises, todas as amostras tiveram seus resultados submetidos à confirmação com a utilização de outras técnicas (PCR-RFLP e sequenciamento direto).

3.2.5 - Padronização da Plataforma Espectrometria de massa iPLEX Gold/Maldi TOF MS (Sequenom Inc.-San Diego, CA).

Foram selecionadas para o estudo três principais mutações primárias da LHON (G11778A, T14484C e G3460A), oito mutações primárias raras (G3733A, C4171A, T10663C, G14459A, C14482A, C14482G, A14495G e C14568T) e os 32 marcadores primários dos 25 haplogrupos mitocondriais humanos (Tabela 11). Todos os dados e sequências foram retiradas do Banco de Dados MitoMap. Todas as análises foram realizadas em todos os 101 pacientes com diagnóstico clínico da LHON ou Neuropatia Óptica de Etiologia a Esclarecer e também nos 100 casos do Grupo Controle Negativo.

Tabela 11 - Haplogrupos e seus respectivos marcadores

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

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

*Letras em negritos representam os haplogrupos

3.2.5.1 - Princípio da Genotipagem usando o System® MassArray da Sequenom, Inc. (San Diego, CA)

O método de genotipagem *System® MassArray da Sequenom, Inc. (San Diego, CA)* permite a genotipagem de baixo custo para até 40 SNPs simultaneamente e quantidades de amostras que podem variar de 96 a 3.840 análises, em apenas dois dias.

No ensaio *iPLEX Gold®*, juntamente com o equipamento Sequenom existe um software para o desenho dos três *primers* necessários para os ensaios com até 95% de eficiência, permitindo flexibilidade para projetar qualquer número de ensaios para uma grande variedade de alvos no genoma.

O ensaio consiste em uma reação de *PCR multiplex* locus-específico, seguido por um PCR de extensão de uma única base que utiliza dideoxinucleotídeos de massa-modificada que se anela exatamente acima da alteração de interesse. Essas amostras são transferidas para um chip e, uma vez que as moléculas da amostra são vaporizadas e ionizadas, são transferidas eletrostaticamente para o espectrômetro de onde são separadas dos íons da matriz, individualmente detectadas com base na sua massa-carga (m/z), e analisadas. Conforme mostra a figura 17:

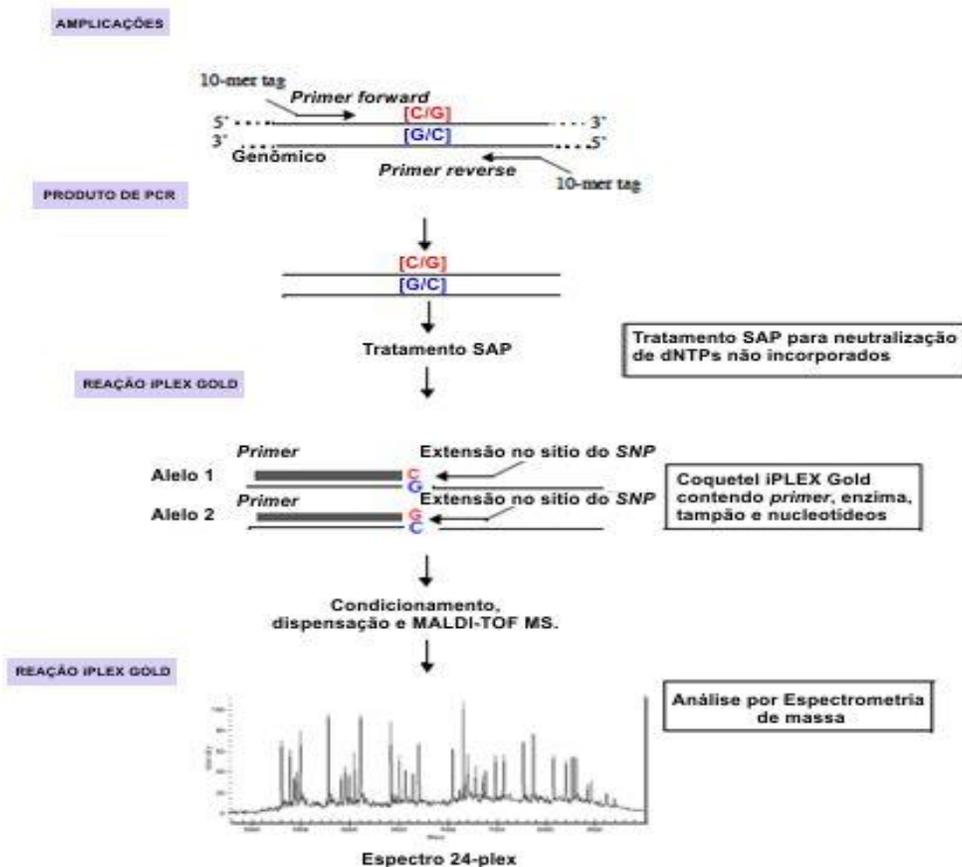


Figura 17 - Esquemática da *iPLEX® Gold Assay* da *Sequenom, Inc.* (San Diego, CA), por meio da técnica *MALDI-TOF MS* (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*)

O sistema é composto por um robô (*MassArray® Liquid Handler Station*), utilizado no preparo das reações de PCR; por um dispensador de amostras (*MassArray® Nanodispenser*), utilizado na transferência dos produtos das reações de PCR para SpectroChips que são avaliados no espectrômetro de massa; e por um espectrômetro de

massa (*MassArray® Compact System*), utilizado na medida das massas das moléculas associadas à matriz do SpectroChip. O sistema é acompanhado de um pacote de softwares que realizam a transferência dos dados em tempo real e geram relatórios com as informações de cada SNP para as amostras analisadas (*MassArray®Typer4.0*).

3.2.5.2 - Realização dos ensaios

3.2.5.2.1 - Definição dos ensaios e Preparo das Amostras

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

A qualidade do espectro em termos de resolução, precisão de massa e sensibilidade são altamente dependentes da preparação da amostra. O processo de purificação deve resultar em uma amostra devidamente concentrada, livre de agentes que perturbem a cristalização, tais como detergente ou DMSO, e agentes formadores de adutos como cátions não-voláteis.

3.2.5.2.2 - Amplificação dos produtos contendo as alterações

Após serem definidas as alterações, os *primers* de captura foram empregados na amplificação de produtos, variando de 100pb a 400pb, englobando a região que apresenta o sítio polimórfico. As amplificações foram efetuadas em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) com dois blocos para placas de 386 amostras, seguindo protocolo descrito pela Sequenom (*iPLEX Gold Application Guide*). Nesta etapa os fragmentos contendo as alterações foram capturados. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 5 microlitro contendo 10ng de DNA molde, tampão 10x, 500 µM de cada dNTP, 25 mM de MgCl₂, 500 nM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e 5 U *HotStar Taq* DNA polimerase.

3.2.5.2.3 - Tratamento com SAP

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

3.2.5.2.4 - Reação de extensão - iPLEX

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

3.2.5.2.5 - SpectroCHIP

Antes da reação de espectrometria de massa, os produtos das reações de *iPLEX* foram submetidos a uma purificação com uma resina (*Clean Resin*) que remove o excesso de íons, que podem interferir na leitura do laser. Foram adicionados 6mg de resina a cada poço da placa com capacidade de 384 amostras e ao volume total são acrescentados 16 μ L de água para completar um volume final de 25 μ L em cada amostra. As reações foram transferidas das placas de 384 para SpectroCHIPS com o auxílio do *MassArray*

Nanodispenser (Sequenom Inc., San Diego - USA). O SpectroCHIP é analisado a partir do *MassArray Analyzer Compact* (Sequenom Inc., San Diego - USA), através da técnica de *MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)*. O processo *MALDI-TOF* é iniciado por uma dessorção a laser da mistura analito-matrix, sendo o analito o produto de amplificação gerado e selecionado durante a reação *iPLEX*. Os subsequentes processos físicos resultam na predominante formação de íons carregados positivo ou negativamente. Esses íons são extraídos com um campo elétrico e separados em função de suas massas moleculares e de suas cargas. As massas dos compostos de ácidos nucleicos são calculadas através do “tempo de voo” (TOF), que reflete o tempo que o composto laser-ionizado e acelerado requer para ser levado através do tubo de vôo (1-2m de comprimento) do analisador TOF e alcançar o detector do instrumento. No detector, os compostos ionizados geram um sinal elétrico que fica gravado por um sistema de dados e é finalmente convertido em um espectro de massa.

3.2.5.2.6 - Análise dos resultados

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

Todos os resultados foram analisados e comparados aos obtidos por outras técnicas (PCR-RFLP, sequenciamento direto e PCR Multiplex).

3.2.6 - Determinação da sensibilidade da plataforma *iPLEX Gold/Maldi TOF MS (Sequenom Inc.-San Diego, CA)* para a detecção das taxas de heteroplasmia.

Primeiramente foram selecionados pacientes previamente analisados molecularmente quanto à presença das mutações G11778A e T14484C. Foram escolhidas amostras de indivíduos mutantes e de indivíduos sem mutações. Todas as amostras tiveram

sua pureza (entre 1,7 a 2,0 na faixa de absorvância A260/A280) e concentração padronizadas (5ng/ μ L).

Com as amostras devidamente padronizadas, foram preparados os 10 ensaios usados no experimento. Esses ensaios foram resultado da mistura, em diferentes proporções, de amostras contendo DNA sem mutação e amostras de DNA com mutação (Tabela 12).

Tabela 12 - Ensaios contendo diferentes proporções (%) de DNA normal e DNA mutante.

ENSAIO	PROPORÇÃO DAS MISTURAS (DNA)
1	100% normal
2	95% normal + 5% mutante
3	90% normal + 10% mutante
4	80% normal + 20% mutante
5	70% normal + 30% mutante
6	60% normal + 40% mutante
7	50% normal + 50% mutante
8	30% normal + 70% mutante
9	10% normal + 90% mutante
10	100% mutante

Após a preparação dos ensaios, estes foram submetidos à genotipagem usando a plataforma *iPLEX Gold/Maldi TOF MS* (Sequenom Inc.-San Diego, CA).

Todo processo citado acima foi feito cinco vezes, para excluir possibilidade de resultados precipitados. Cada uma dessas repetições foi realizada com 3 pares de pacientes diferentes, ou seja, cada vez eram formadas duplas distintas de indivíduos mutantes e normais. É importante frisar que todo o processo foi realizado primeiro com a mutação G11778A e depois com a mutação T14484C para evitar que houvesse qualquer risco de troca ou mistura entre as duas mutações.

3.2.7 - Rastreamento de mutações relacionadas à ADOA no gene nuclear *OPAI*

Os dados relativos ao rastreamento das mutações relacionadas à ADOA no gene *OPAI*, como informações sobre os íntrons, os éxons, as mutações e alterações, foram baseados no maior Banco de Dados sobre Atrofia Óptica Autossômica Dominante, o MitoDyn.org (<http://mitodyn.org>). O transcrito utilizado foi ENST00000392438 (retirado de *Ensembl Genome Browser* - acessado 15 de fevereiro de 2010).

Foram desenhados e sintetizados oito pares de *primers* para o rastreamento de 10 éxons do gene *OPAI*(tabela 13).

Tabela 13 - Lista de éxons estudados do gene *OPAI* e suas respectivas sequências e temperaturas de anelamento.

REGIÃO	ÉXONS	PRIMERS (5'-3')	TM*
1	1	F - CTA GAA AGG GTG AAG TGG TTG	56,0°C
		R - CCT GTC ATT CTG GGT CCT C	
2	2	F - GTA TGG GGC TGT GTT TCC	54,0°C
		R - GGC ATC TTC CTA TTA GCA TC	
3	8	F - GTT TTA GTT TTT ACG ATG AAG ATG	56,0°C
		R - GGC TAA TTT AAT CCA CTG TTC AG	
4	9	F - CAG TGG ATC CAG TTA TAG TTT TGC	60,4°C
		R - GCT GTG CCT TCT ACT GAT TTC C	
5	12	F - GAC AAA TTC CCC CCA AAC	55,2°C
	13	R - GCT AAA GAA GAA AAC ATA TCA GTA C	
6	15	F - GCT TTT GTG CAG ATT TAT TTA AC	56,8°C
	16	R - GCT CTC AAT TCT GCC AAA AAG	
7	26	F - CAT GGC TCC GTA CAG AAA GG	58,6°C
		R - CTC GGC CTC TCA ACA TGC	
8	27	F - GAG ACT ATA TAG GTT TCA TGC TG	55,0°C
		R - GAT CTT CTG ACC TTG TTT TCC	

* - TM - Temperatura media de anelamento dos *primers*

F- *Forward*

R - *Reverse*

Os éxons foram escolhidos para o estudo levando em consideração a quantidade e importância das mutações que poderiam ser encontradas nos mesmos. Nesses 10 éxons foram descritas até o presente momento, em outros estudos, 111 mutações. Os éxons e suas respectivas mutações estão compilados no Anexo 2 (tabela 16)

Para o rastreamento das mutações as regiões de interesse foram amplificadas e os produtos das ampliações foram submetidos ao sequenciamento direto.

RESULTADOS

4. Resultados

4.1 - Rastreamento das Mutações Primárias

Foram estudados 101 pacientes para verificar a presença e a frequência das três principais mutações primárias G11778A, T14484C e G3460A.

A mutação G11778A foi encontrada em um total 30 pacientes (83.3%) e a mutação T14484C em 6 casos (16.7%). Porém a mutação G3460A não foi encontrada em nenhum dos indivíduos analisados. Um total de 65 casos (64,4%) não possuía nenhuma das alterações rastreadas. A tabela 14 apresenta o resumo dos resultados obtidos:

Tabela 14 - Resumo dos resultados encontrados para o rastreamento das três principais mutações primárias.

Mutação	Número de pacientes	Mutações primárias (%)	Total (%)
G11778A	30	83,3	29,7
T14484C	6	16,7	5,9
G3460A	0	0	0
Sem mutação *	65	0	64,4

*Pacientes nos quais não foram encontradas as mutações primárias

Analisando somente os 67 membros do Grupo com diagnóstico clínico de LHON, foi encontrada a mutação G11778A em 21 casos (31,4%) e a mutação T14484C em 3 pacientes (4,5%). Os indivíduos em que não foram encontradas mutações representam 43 casos (64,1%).

Levando em consideração os pacientes do Grupo com Neuropatia Óptica de Etiologia à Esclarecer(NOEE), foram encontrados 9 pacientes com a mutação G11778A e 3 com a mutação T14484C, representando, respectivamente, 26,4% e 8,8% dos casos analisados. Não foram encontradas mutações rastreadas em 34 pacientes, ou seja, 64,7% dos casos.

4.1.1 - Mutação G11778A no gene *MT-ND4*

Trinta casos apresentaram a mutação G11778A. A análise dessa mutação foi realizada por PCR-RFLP (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.

Dos 101 analisados, em 71 indivíduos houve a clivagem dos fragmentos amplificados, gerando fragmentos de 17 e 32pb, o que significou que a sequência era normal. Porém, nos 30 casos restantes o sítio de *SfaN* I foi excluído e os fragmentos permaneceram com 49pb. Fato esse que comprova a presença da mutação nessa região. A figura 18 exemplifica o padrão de bandas para os resultados positivos e negativos da mutação G11778A.

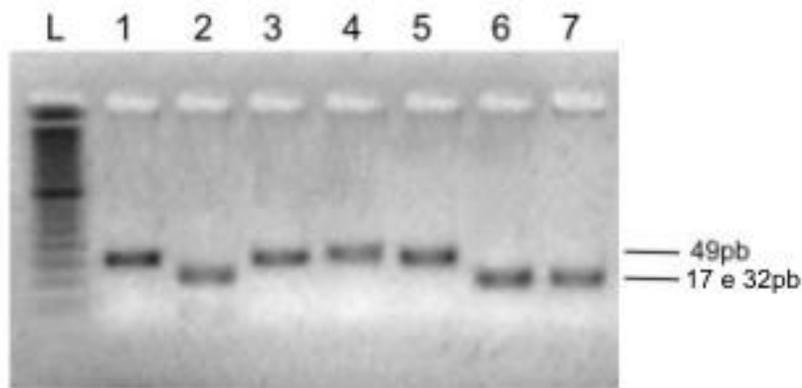


Figura 18 - Padrão de bandas para a mutação G11778A em gel de agarose 3%. (L) *Ladder* 10pb Invitrogen®. (1) Controle mutante. (2) Controle sem mutação. (3)-(5) indivíduos mutantes. (6), (7) indivíduos sem a mutação.

4.1.2 Mutação T14484C no gene *MT-ND6*

A mutação T14484C foi encontrada em 6 pacientes. O resultado também foi obtido utilizando o método de PCR-RFLP. O fragmento foi amplificado e os fragmentos foram submetidos à digestão com enzima de restrição *BsaB* I.

Em gel de agarose, foram observados fragmentos de 135pb (nos pacientes normais) e 154pb (indivíduos mutantes). A clivagem da enzima *BsaB* I gerou fragmentos de 135pb e fragmentos de apenas 19pb. 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 (Figura 19).

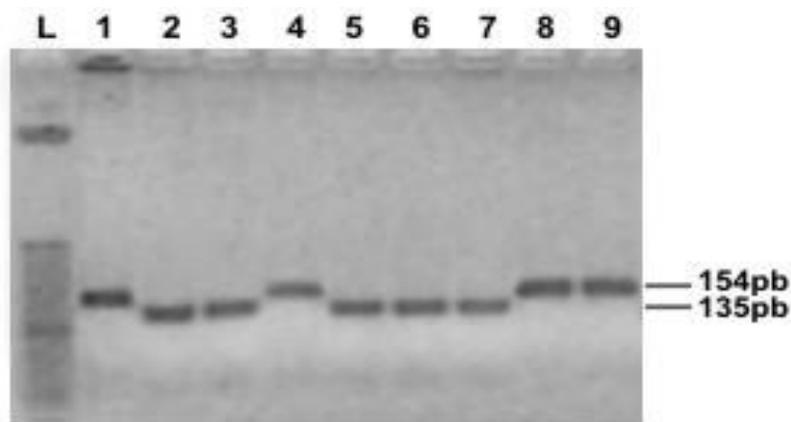


Figura 19 - Padrão de bandas para a mutação T14484C em gel de agarose 3%. (L) *Ladder* 10pb Invitrogen®; (1) Controle mutante; (2) controle normal; (3), (5), (6) e (7) pacientes sem mutação; (4), (8) e (9) pacientes com a mutação.

4.1.3 - Mutação G3460A no gene *MT-ND1*

Apesar do rastreamento da mutação primária G3460A ser realizado nos 101 indivíduos estudados, a alteração não foi encontrada em nenhum dos casos.

4.2 - Rastreamento de mutações primárias raras e mutações candidatas da LHON.

Foram rastreados 101 pacientes para a detecção das mutações primárias raras (G3635A, G3700A, G3733A, C4171A, T10663C, G14459A, C14482A, C14482G, A14495G, T14502C e C14568T) e das mutações candidatas da LHON (C4025T, T4160C, T11253C, A11696G, A13637G, G13730A, G14831A, C14898T, G14596A e G15257A).

Foram amplificados os fragmentos das regiões de interesse e posteriormente foi realizado o sequenciamento direto para detecção das 21 mutações. Porém não foram encontradas alterações/mutações que pudessem ser relacionadas à LHON.

4.2.1 - Outras alterações encontradas

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

4.2.1.1 - Alteração C4167T no gene *MT-ND1*

Foi encontrada a alteração C4167T no gene *MT-ND1* em estado de homoplasmia. A alteração foi encontrada em seis dos pacientes e foi considerada uma mutação silenciosa, pois não efetuou troca de aminoácido. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 20 e figura 21 :

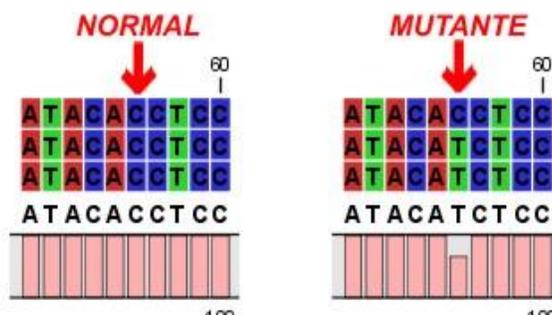


Figura 20 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base C no paciente normal para a base T no paciente que apresentou a alteração C4167T.

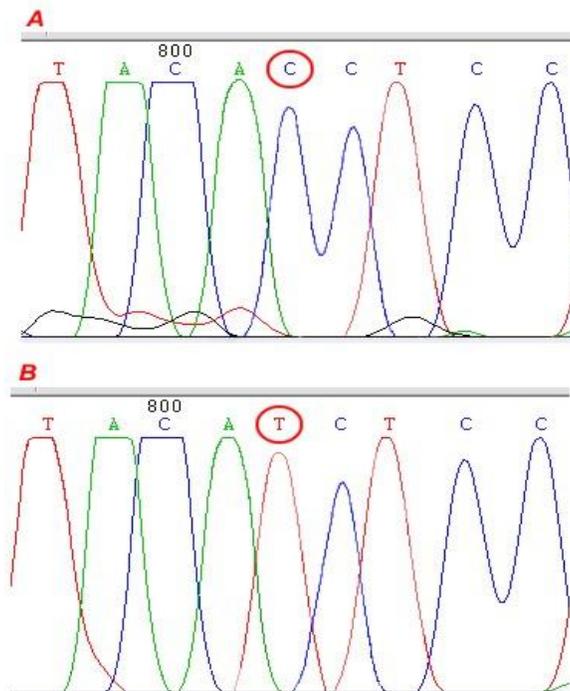


Figura 21 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração C4167T. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

4.2.1.2 - Alteração T11697C no gene *MT-ND4*

A alteração T11697C no gene *MT-ND4* foi encontrada em estado de homoplasmia. Essa mudança de uma timina para uma citosina na posição 11697 foi encontrada em quatro dos pacientes e foi considerada uma mutação silenciosa, pois não efetuou troca de aminoácido. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer 6.0.1*, conforme ilustrado na figura 22 e figura 23:

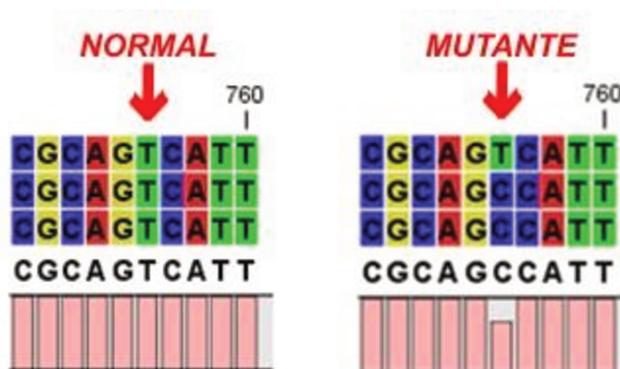


Figura 22 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base T no paciente normal para a base C no paciente que apresentou a alteração T11697C.

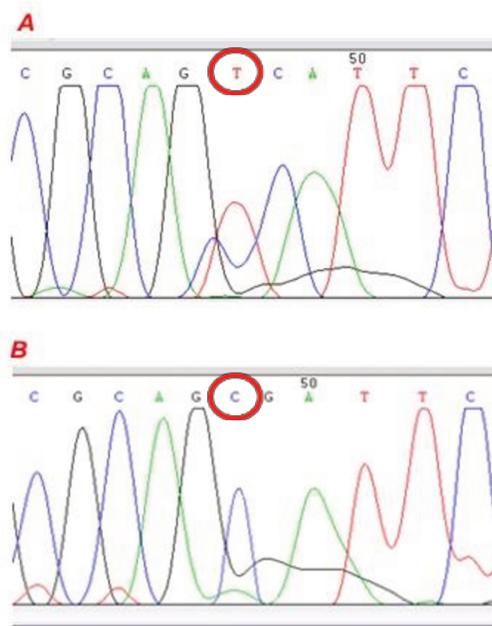


Figura 23 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração T11697C. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

4.2.1.3 - Alteração G11719A no gene *MT-ND4*

Foi encontrada a alteração G11719A no gene *MT-ND4* em estado de homoplasmia. A alteração foi encontrada em 39 pacientes, porém foi considerado um polimorfismo segundo dados da literatura (melhor explicado na discussão). O resultado do

sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 24 e figura 25:

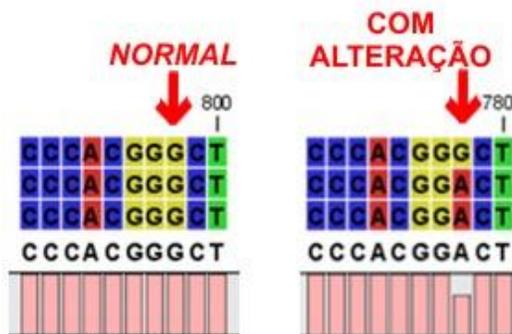


Figura 24 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base G no paciente normal para a base A no paciente que apresentou a alteração G11719A.

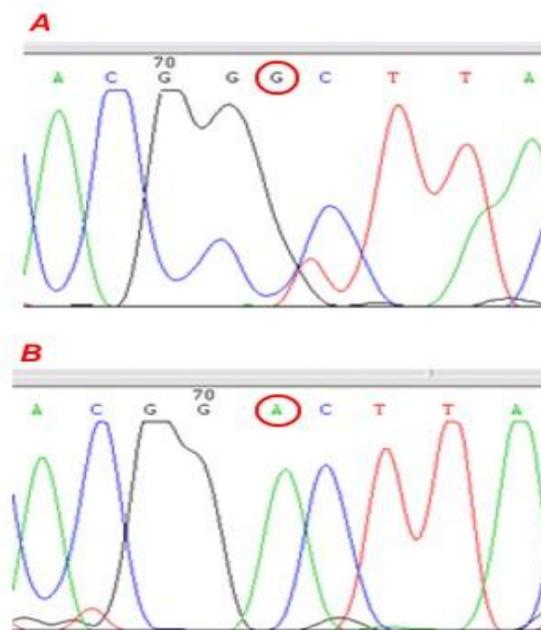


Figura 25 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração G11719A. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

4.2.1.4 - Alteração G14560A no gene *MT-ND6*

Foi encontrada a alteração G14560A no gene *MT-ND6* em estado de homoplasmia. A alteração foi encontrada em apenas cinco pacientes. Segundo os dados da literatura, essa

alteração foi considerada um polimorfismo, e será mais bem detalhada na discussão. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 26 e figura 27:

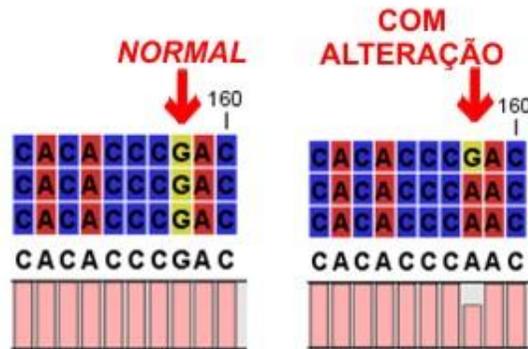


Figura 26 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando a mudança da base G no paciente normal para a base A no paciente que apresentou a alteração G14560A.

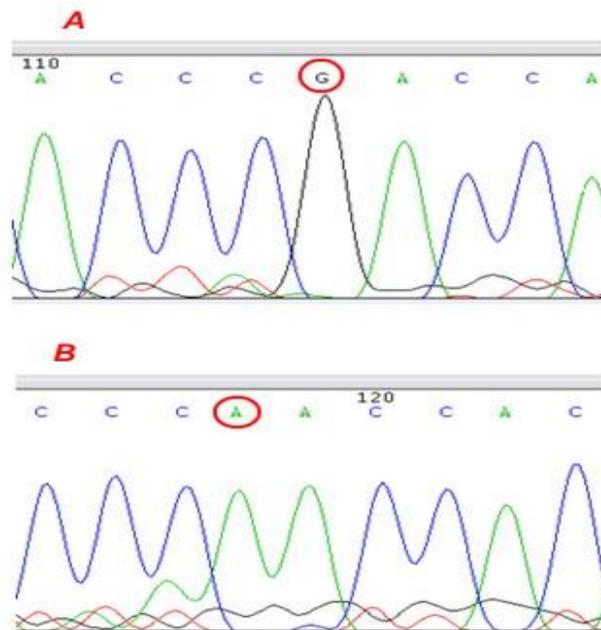


Figura 27 - Eletroferograma mostrando indivíduo homoplásmico para a alteração G14560A. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

4.3 - Otimização do método de PCR Multiplex Alelo-Específico para o rastreamento das mutações primárias

A adaptação do método de PRC Multiplex Alelo-Específico foi bem sucedida. Foram utilizados reagentes comumente usados no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG - UNICAMP, mas não foi possível reduzir as concentrações usadas e nem o volume final da reação.

Para dar maior estabilidade à reação, foi adicionado o adjuvante DMSO, que também possibilitou uma maior definição nas bandas geradas após a corrida do produto da PCR no gel de agarose 1,5% (Figura 28).

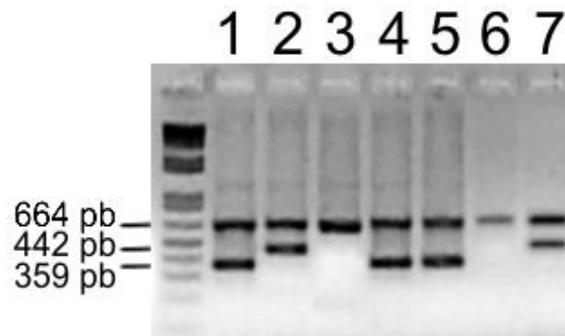


Figura 28 - Padrão de bandas da reação de PCR Multiplex Alelo-Específico para o rastreamento das mutações primárias da LHON em gel de agarose 1,5%. (L) *Ladder* 1kb *plus* Invitrogen®. (1) Controle positivo G11778A; (2) Controle positivo T14484C; (3) Controle normal; (4) e (5) Pacientes mutantes para G11778A; (6) Paciente normal; (7) Paciente com a mutação T14484C.

E no último passo, foram feitas alterações no número de ciclos (de 30 para 28) e no tempo de extensão da fita de DNA (de 35 segundos para 30 segundos), reduzindo o tempo que a reação leva no termociclador em 16.7%, ou seja, aproximadamente 15 minutos.

Os melhores resultados na adaptação do método foram obtidos em uma reação com volume final de 20µL, contendo: 1,5mml/Lde tampão de PCR 10X (Tris-HCl 10mM pH 8,8 - Invitrogen™), 1,5mml/Lde MgCl₂ (50mM - Invitrogen™), 0,15 µmol/l de cada *primer* das mutações (G11778A, T14484C e G3460A), 0,05 µmol/l do *primer* de controle de reação e 50ng do DNA a ser estudado 175mml/Lde cada dNTP (100 mM -

Invitrogen™), 4% de DMSO e 0,5 unidades de *Taq* DNA Polymerase (Brasil - *Invitrogen™, Life Technologies*). As condições estabelecidas no termociclador foram: pré-desnaturação de 5 minutos a uma temperatura de 94 °C; 28 ciclos de amplificação de 94 °C durante 30 segundos, 54 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 30 segundos; e um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72 °C durante 7 min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e levado ao transiluminador com lâmpada ultravioleta para visualização e análise.

A otimização da técnica de PRC Multiplex Alelo-Específico foi realizada para o rastreamento das mutações primárias G11778A e T14484C. Porém, não foi possível verificar a sensibilidade do método na detecção da mutação G3460A, pois esta não foi encontrada no estudo. Após a padronização da metodologia, esta foi utilizada em todos os 101 pacientes já rastreados pelo método de PCR-RFLP e se mostrou extremamente fiel no que diz respeito à confirmação dos resultados já obtidos anteriormente.

4.4 - Padronização da plataforma de genotipagem *TaqMan® OpenArray® Genotyping* para o rastreamento das três principais mutações primárias da LHON.

A padronização da plataforma de genotipagem *TaqMan® OpenArray® Genotyping* foi realizada com sucesso para o rastreamento das três principais mutações primárias da LHON. Todas as 101 amostras tiveram seus resultados gerados com eficácia e eficiência. Os resultados encontrados são idênticos aos obtidos utilizando em outras técnicas, ou seja, foram encontrados 30 mutantes para a mutação G11778A e 6 portadores da mutação T14484C.

As figuras 29, 30 e 31 exemplificam os padrões gráficos gerados no experimento:

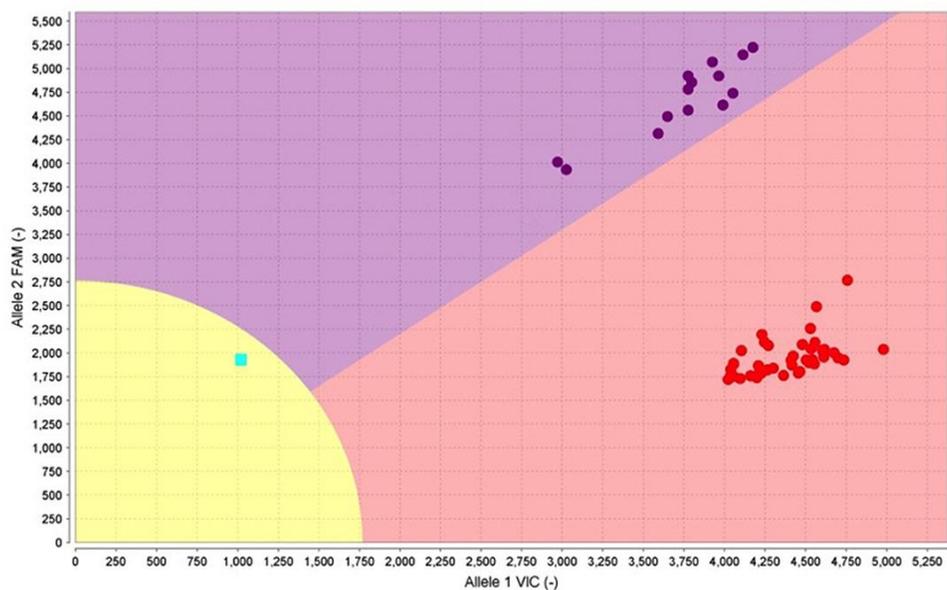


Figura 29 - Gráfico gerado pelo software *TaqMan® Genotyper* para o rastreamento da mutação primária G11778A. O grupo vermelho representa indivíduos normais, com apenas VIC fluorescência. O grupo roxo representa os indivíduos mutantes, com apenas FAM fluorescência.

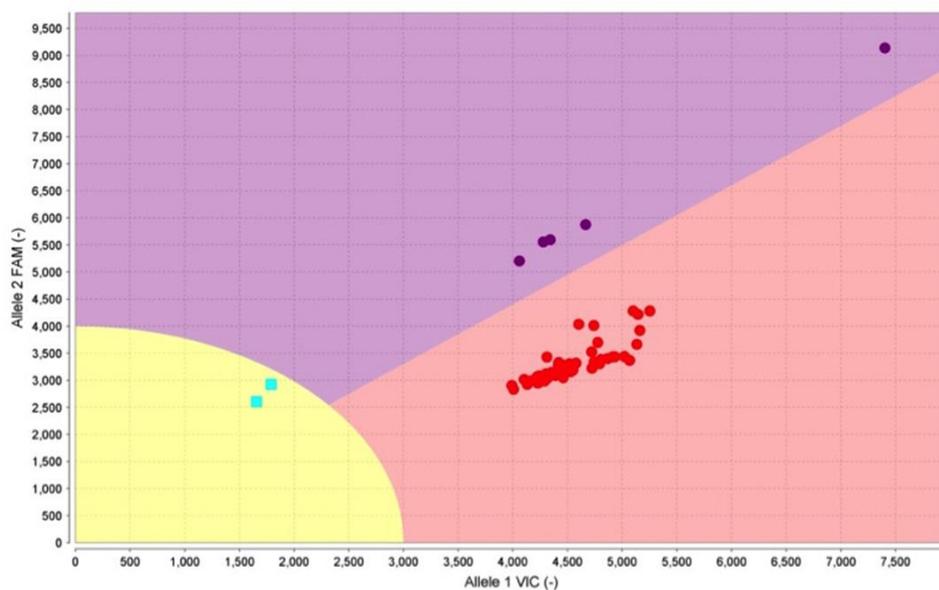


Figura 30 - Gráfico gerado pelo software *TaqMan® Genotyper* para o rastreamento da mutação primária T14484C. O grupo vermelho representa indivíduos normais, com apenas VIC fluorescência. O grupo roxo representa os indivíduos mutantes, com apenas FAM fluorescência.

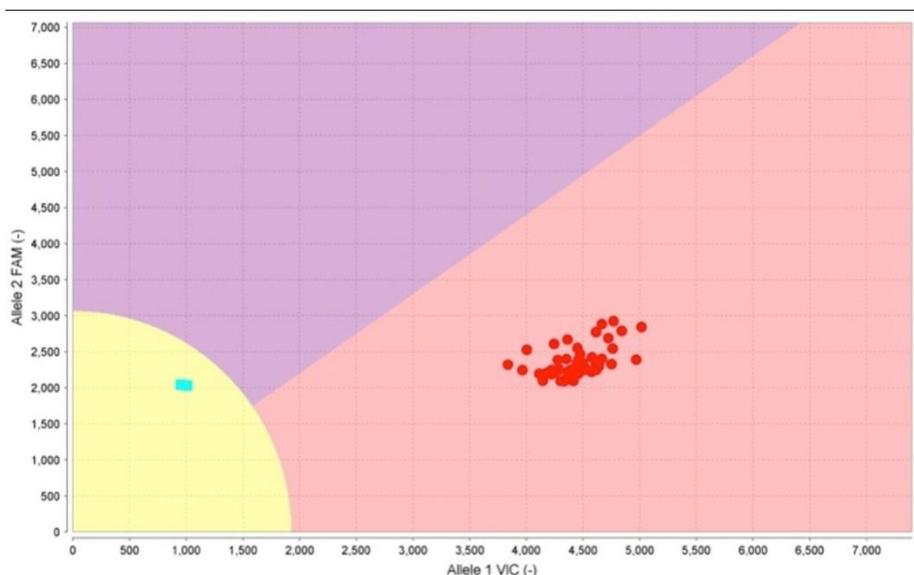


Figura 31 - Gráfico gerado pelo software *TaqMan® Genotyper* para o rastreamento da mutação primária G3460A. O grupo vermelho representa indivíduos normais, com apenas VIC fluorescência.

4.5 - Padronização da plataforma de espectrometria de massa *IPLEX GOLD/MALDI TOF MS (SEQUENOM INC.- SAN DIEGO, CA)*.

A plataforma de espectrometria de massa *IPLEX GOLD/MALDI TOF MS (SEQUENOM INC.- SAN DIEGO, CA)* se mostrou um método confiável para o rastreamento de mutações primárias da LHON e dos haplogrupos mitocondriais humanos. A técnica foi validada através dos outros métodos utilizados no estudo (PCR-RFLP, PCR Multiplex Alelo-Específico, *TaqMan® OpenArray®* e sequenciamento direto).

4.5.1 - Rastreamento de 11 mutações primárias da LHON

A técnica foi padronizada fazendo o rastreamento de 11 mutações primárias da LHON nos 101 indivíduos previamente rastreados por outras técnicas. Todos os resultados foram compatíveis com os relatados por outros métodos. Nenhum dos 100 indivíduos do grupo controle negativo apresentou qualquer mutação. As figuras 32 e 33, respectivamente,

representam o padrão gráfico gerado pelo software de análise *MassArray® Typer 4.0*, da Sequenom.

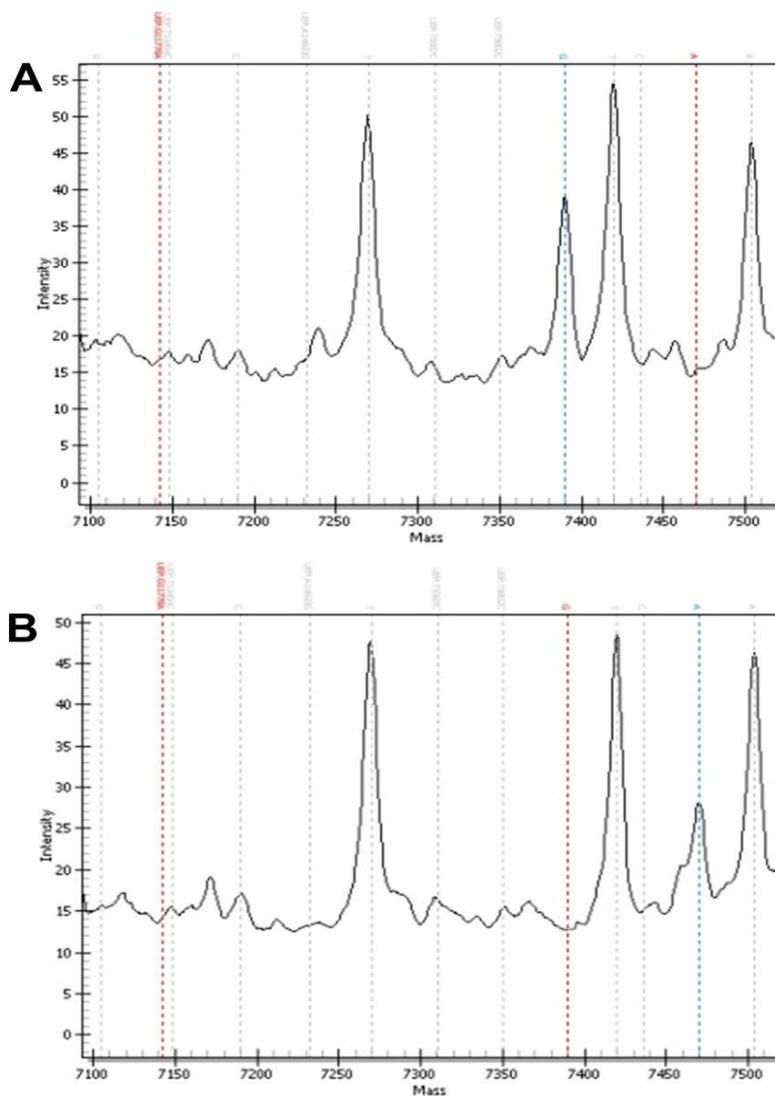


Figura 32 - Padrão gráfico gerado pelo software *MassArray® Typer 4.0* no rastreamento da mutação primária G11778A. a) Indivíduo normal / b) Indivíduo mutante. Linha tracejada em azul representa na figura A a base G e na figura B a base A.

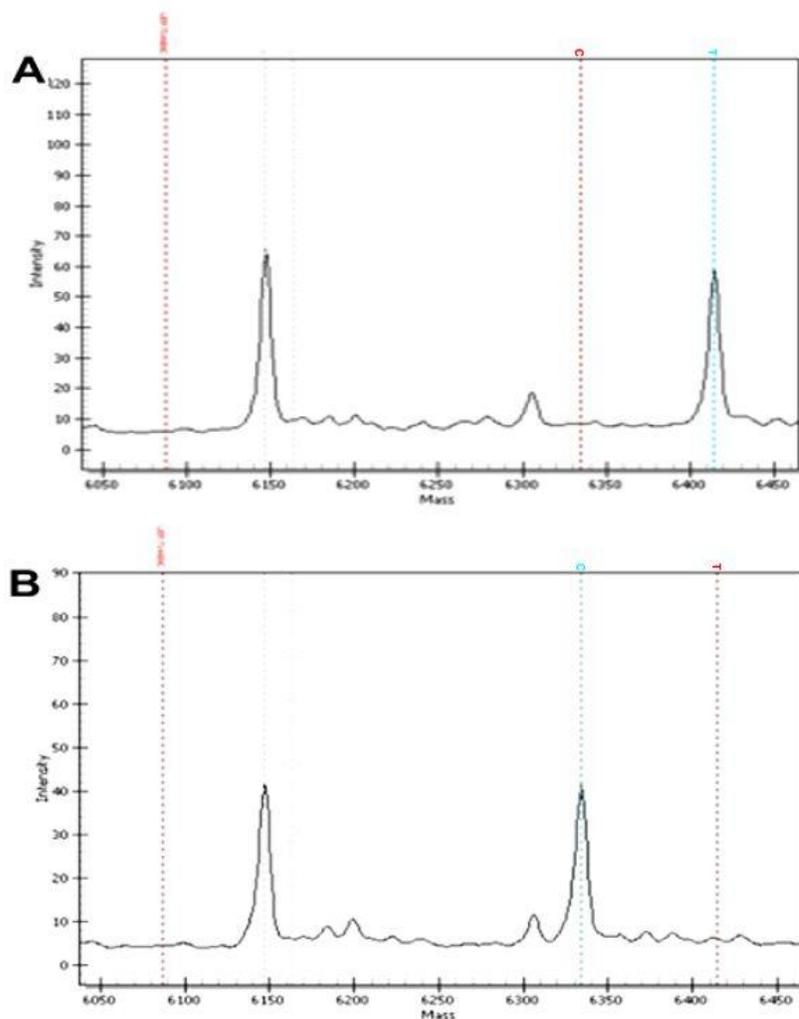


Figura 33 - Padrão gráfico gerado pelo software *MassArray® Typer 4.0* no rastreamento da mutação primária T14484C. a) Indivíduo normal / b) Indivíduo mutante. Linha tracejada em azul representa na figura A a base T e na figura B a base C.

4.5.2 - Rastreamento dos haplogrupos mitocondriais humanos

Os marcadores específicos para a determinação dos haplogrupos de todos os indivíduos analisados foram rastreados utilizando a plataforma de espectrometria de massa *IPLEX GOLD/MALDI TOF MS (SEQUENOM INC.- SAN DIEGO, CA)*.

Se analisarmos apenas os haplogrupos dos 36 casos que apresentaram resultado positivo para uma das mutações primárias da LHON, foram detectados 7 haplogrupos diferentes (L1/L2, L3, C, R, H, U e D). Já os 65 pacientes em que não foram encontradas mutações, foram detectados 8 haplogrupos distintos (L1/L2, L3, R, X, C, H, T e K). Os resultados encontrados estão compilados na tabela 15.

Tabela 15 - Haplogrupos mitocondriais encontrados em pacientes mutantes e normais

Mutação	Casos	Haplogroups
G11778A	30/101	L1/L2 (15) - L3 (8) - C (3) - R (1) - H (1) - U (1) - D (1)
T14484C	6/101	L1/L2 (2) - L3 (3) - U (1)
Sem mutações	65/101	L1/L2 (11) - L3 (24) - R (15) - X (2) C (4) - H (5) - T (2) - K (2)

Números descritos entre parênteses “()” representam a quantidade de indivíduos encontrados para o respectivo haplogrupo.

Os indivíduos do grupo controle negativo também foram avaliados e foram detectados os seguintes haplogrupos: L1/L2 (35 casos), L3 (28 casos), R (12 casos), C (7 casos), H (6 casos), D (4 casos), M (2 casos), X (2 casos), J (2 casos), T (1 caso) e U (1 caso).

4.5.3 - Determinação da sensibilidade da plataforma *iPLEX Gold/Maldi TOF MS (Sequenom Inc.-San Diego, CA)* para a detecção de baixas taxas de heteroplasmia.

O experimento da determinação da sensibilidade para a detecção de baixas taxas de heteroplasmia obteve resultados confiáveis em todas as repetições das duas mutações. A plataforma o *Iplex Gold/MALDI-TOF MS* foi capaz de detectar uma taxa mínima de 10% de heteroplasmia em ambas as mutações (Figura 34 e figura 35).

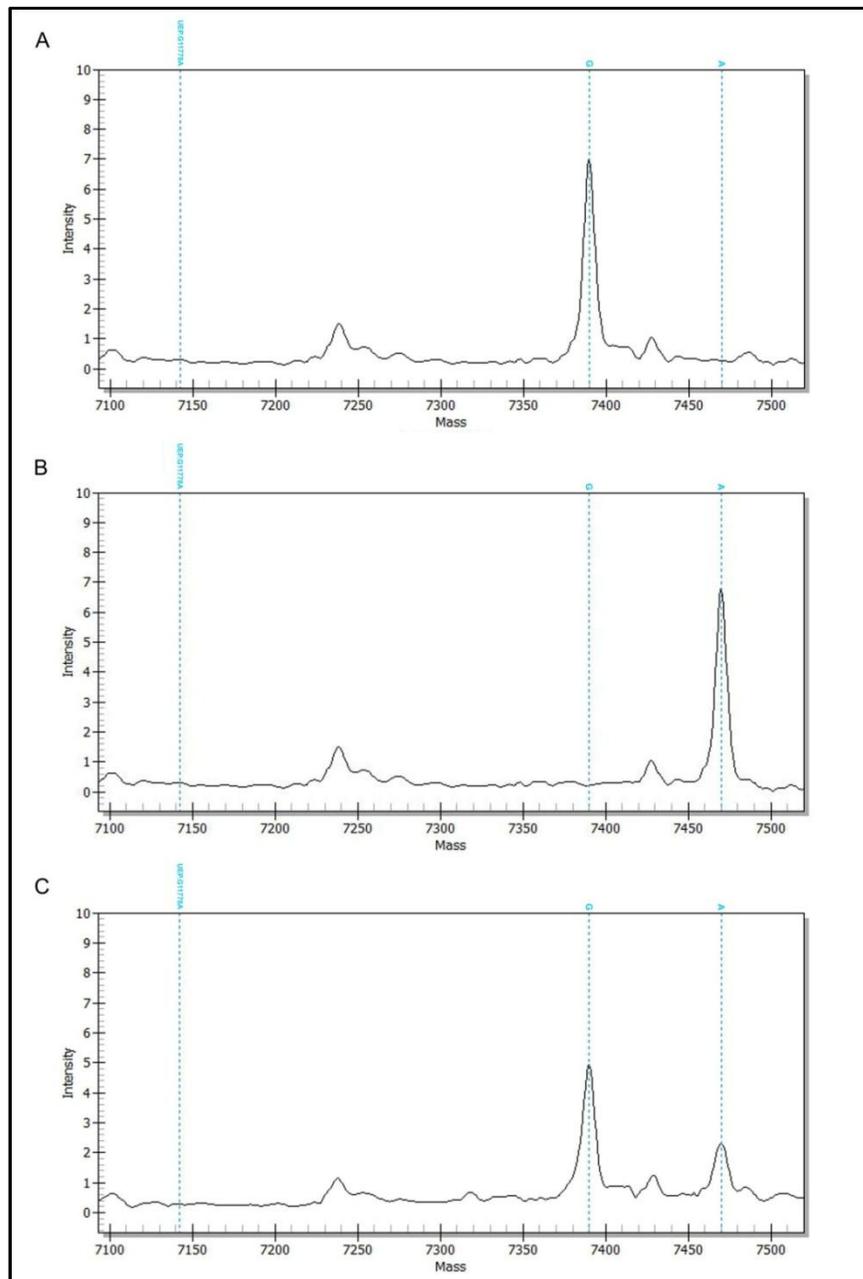


Figura 34 - Padrão gráfico gerado pelo software *MassARRAY*® *Typer 4.0* para o rastreamento da mutação G11778A. A primeira linha a tracejado assinala os iniciadores da região de controle (nenhum pico nesta região significa sucesso na utilização dos *primers*). A segunda linha pontilhada demarca a região da possível presença de base G. A terceira linha tracejada mostra a possível região da possível presença da base A. A - Indivíduo com 100% de mtDNA normal. B - Indivíduo com 100% de mtDNA mutante. C - Indivíduo com 90% de mtDNA normal e 10% do mtDNA mutante.

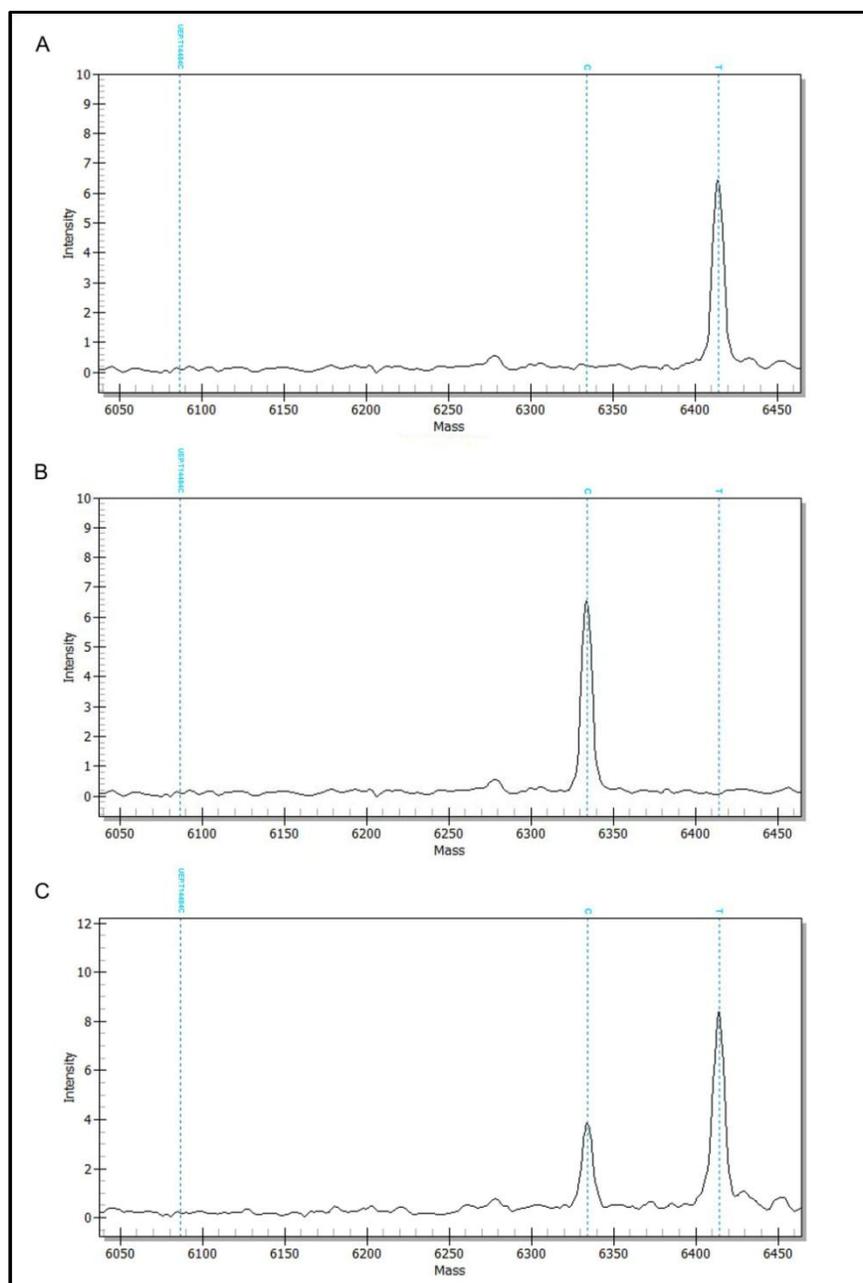


Figura 35 - Padrão gráfico gerado pelo software *MassARRAY*® *Typer 4.0* para o rastreamento da mutação T14484C. A primeira linha a tracejado assinala os iniciadores da região de controle. A segunda linha pontilhada demarca a região da possível presença de base C. A terceira linha tracejada mostra a possível região da possível presença da base T. A - Indivíduo com 100% de mtDNA normal. B - Indivíduo com 100% de mtDNA mutante. C - Indivíduo com 90% de mtDNA normal e 10% do mtDNA mutante.

4.6 - Rastreamento de mutações relacionadas à ADOA no gene nuclear *OPAI*.

Os éxons 1, 2, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 26 e 27 do gene *OPAI* foram sequenciados para o rastreamento de mutações que apresentassem relação com a Atrofia óptica Autossômica Dominante.

Apesar de o rastreamento ser realizado nos 101 indivíduos estudados, nenhuma alteração relacionada à ADOA foi encontrada.

No rastreamento, foi possível detectar outras alterações sem relação com a ADOA.

4.6.1 - Outras alterações encontradas

Apesar de não terem sido encontradas mutações ou alterações relacionadas à ADOA nos 101 indivíduos estudados, foram detectadas outras alterações no gene *OPAI*, que segundo dados da literatura, são consideradas polimorfismos.

4.6.1.1 - Polimorfismo rs73205350

Na região intrônica entre os éxons 12 e 13 foi encontrado o polimorfismo rs73205350. A alteração foi encontrada em apenas um caso em heterozigose. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 36 e figura 37:

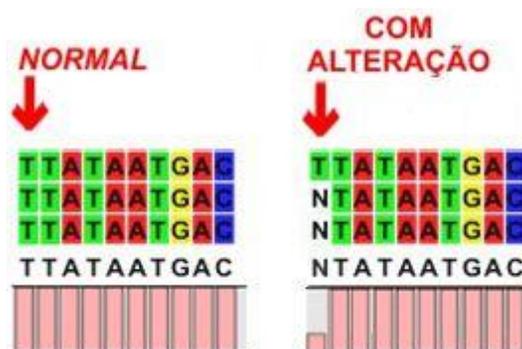


Figura 36 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs73205350.

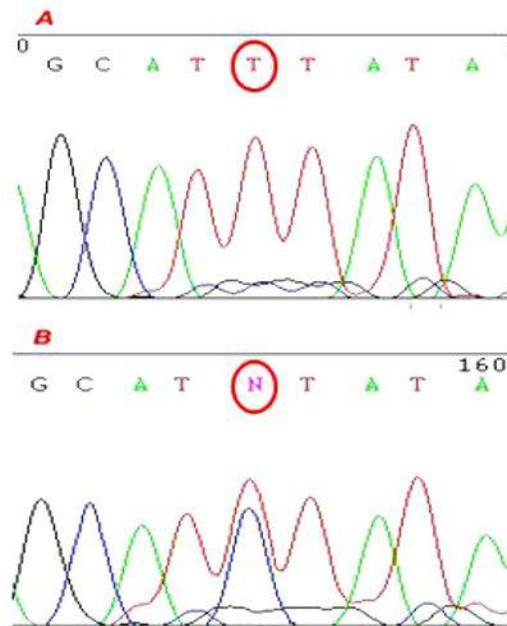


Figura 37 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs73205350. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

4.6.1.2 - Polimorfismo rs34222475

O polimorfismo rs34222475 foi localizado na região intrônica entre os éxons 15 e 16 do gene *OPA1*. Essa alteração foi encontrada em 2 casos. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 38 e figura 39:

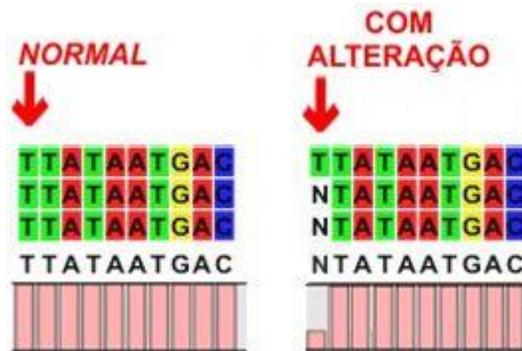


Figura 38 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs34222475.

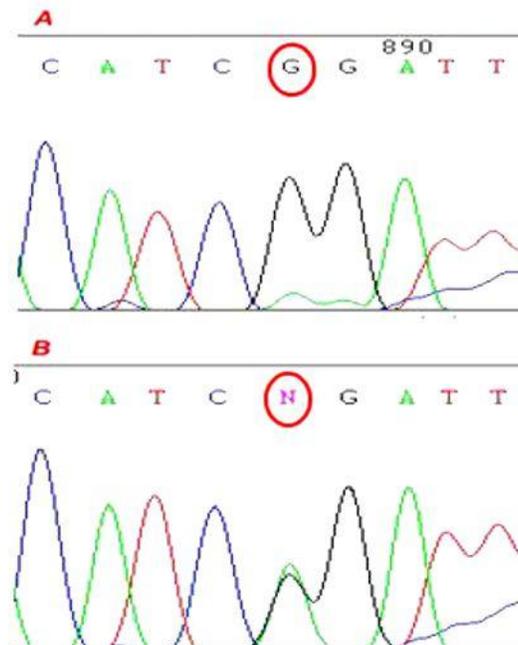


Figura 39 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs34222475. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

4.6.1.3 - Polimorfismos rs10451941, rs166850 e rs76253392

Nas regiões intrônicas entre os éxons 8 e 9 foram encontradas 3 alterações: polimorfismos rs10451941, rs166850 e rs76253392.

O polimorfismo rs10451941 foi detectado em 41 casos, dos 101 estudados. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 40 e figura 41:

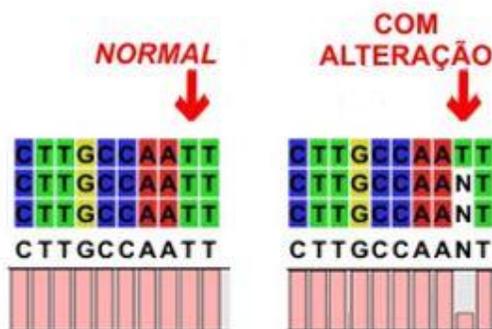


Figura 40 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs10451941.

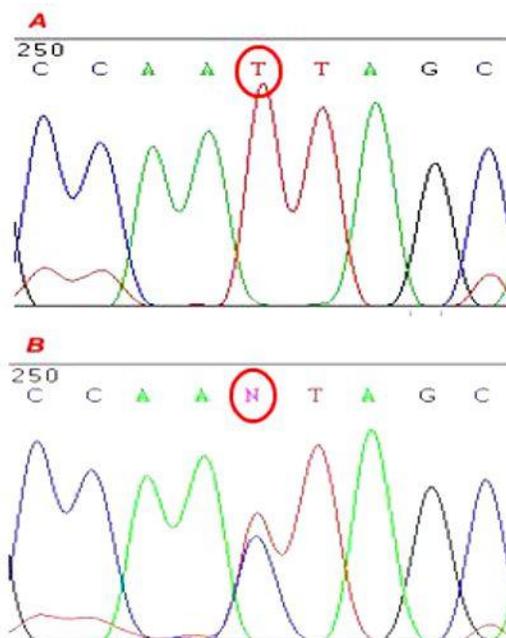


Figura 41 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs10451941. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

Também foram encontrados 49 casos portadores do polimorfismo rs166850. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 42 e figura 43:

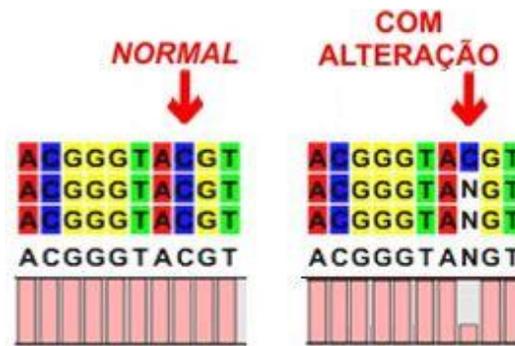


Figura 42 - Comparação de imagens do *CLC Sequence Viewer* mostrando o indivíduo normal e o portador do polimorfismo rs166850.

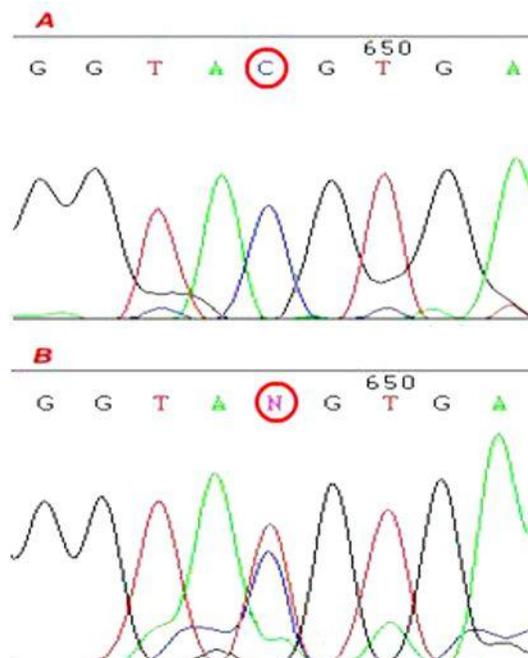


Figura 43 - Eletroferograma mostrando indivíduo heterozigoto portador do polimorfismo rs166850. A- indivíduo sem a alteração; B- Indivíduo portando a alteração.

Encontrado em apenas um caso, o polimorfismo rs76253392 também está localizado entre os éxons 8 e 9. O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando os programas *Chromas Lite* e *CLC Sequence Viewer* 6.0.1, conforme ilustrado na figura 44 e figura 45:

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A Neuropatia Óptica Hereditária de Leber (LHON) e a Atrofia Óptica Autossômica Dominante (ADOA ou OPA1) são doenças caracterizadas pela perda bilateral da visão, devido a uma degeneração do nervo óptico. Apesar de terem sido descritas a primeira vez há muitas décadas, só tiveram seus estudos moleculares mais detalhados nos últimos anos. A LHON, apesar de ser relatada inicialmente em 1871, só passou a ser mais estudada quase 100 anos depois, por volta dos anos 80, havendo maior detalhamento nos estudos e aumento do número de pesquisas realizadas na última década. O mesmo ocorreu com a ADOA, que apesar de ter suas descrições preliminares divulgadas em 1897 e ter sido oficialmente descrita por Paul Kjer em 1959, só teve os primeiros estudos moleculares realizados nos últimos 15 anos. Por esse motivo, até o presente momento não está totalmente elucidado como as mutações agem no funcionamento das mitocôndrias e nem como essas alterações influenciam nas células do nervo óptico. Outro ponto que precisa ser respondido é qual o real número de mutações responsáveis pelas doenças. Tanto na LHON quanto na ADOA, o número de mutações ainda é motivo de divergências entre os autores. Na LHON o número já foi de 14 mutações, passando para 21 e atualmente é de 32 (Yu-Wai-Man et al., 2009; <http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON> - Acessado 07 de julho de 2014). No caso da ADOA esse número de mutações vem frequentemente aumentando, passando de 200 (no ano de 2011) para 334 (em 2014). Porém, apesar do número crescente das mutações relacionadas à LHON e a ADOA, não há na literatura pesquisas mais abrangentes sobre a presença e frequências das mutações no Brasil, o que dificulta reunir dados que possam ajudar no entendimento destas doenças em território brasileiro. Por esse motivo o presente estudo teve como principal objetivo rastrear alterações relacionadas à LHON e à ADOA em indivíduos brasileiros com diagnóstico clínico de LHON ou neuropatia óptica de etiologia a esclarecer.

No desenvolvimento desse estudo aconteceram constantes mudanças nos principais Bancos de Dados relacionados à LHON e ADOA. No caso da LHON, o MitoMap.org sofreu alterações importantes nos últimos 4 anos. A principal alteração foi a forma como as mutações foram classificadas. Anteriormente, as mutações eram rotuladas de acordo com a

frequência, ou seja, quando mais frequentes eram chamadas de Mutações Primárias (3 principais mutações em 95% dos casos) e quando menos frequentes eram denominadas Mutações Secundárias (18 mutações em apenas 5% dos casos). Atualmente essa classificação foi alterada, passando a serem divididas em Mutações Primárias Principais (uma das 3 mutações em 95% dos indivíduos), Mutações Primárias Raras (11 mutações) e Mutações candidatas (18 mutações). Com essa mudança, algumas mutações que eram consideradas importantes passaram a ter sua efetividade contestada, sendo incluídas no grupo das mutações candidatas, como é o caso das mutações T4160C, T11253C, A11696G, A13637G, G13730A, G14831A, C14898T, G14596A e G15257A (Yu-Wai-Man et al., 2009; <http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON> - Acessado 07 de julho de 2014). Outra alteração importante foi no maior Banco de Dados relacionado à ADOA. O antigo Banco de Dados eOPA1, que apresentava uma interface extremamente útil e intuitiva, com inúmeras informações referentes à ADOA e suas alterações relacionadas, foi parcialmente excluído, tendo as informações mais relevantes migradas para um outro grande Banco de Dados: O MitoDyn.org (*MITOchondrial DYNamics variation pages*). O MitoDyn é claramente inferior ao seu antecessor, tanto em interface quanto em número de informações importantes sobre a doença. Mas o que mais chama a atenção é o fato de muitas mutações mais recentes adicionadas ao Banco de Dados ainda não terem sido totalmente confirmadas como causadoras da ADOA (http://mitodyn.org/home.php?select_db=OPA1 - Acessado 12 de julho de 2014). Porém, mesmo após as mudanças tanto o MitoMap quanto o MitoDyn ainda se mostram como os principais Bancos de Dados relacionados à LHON e à ADOA, pois continuam possuindo grande número de informações e suas referências são sempre confiáveis e atualizadas.

Para o rastreamento da LHON, o diagnóstico molecular é geralmente baseado em testes realizados utilizando DNA de mitocôndrias presentes no sangue periférico. Mroczek-Tonslka e colaboradores (2003), afirmaram que 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. Porém, a possibilidade de os níveis de mutações em linfócitos e nas células do nervo óptico ser diferentes é bastante latente. Por

isso, há a probabilidade da obtenção de resultados divergentes no estudo (MAN et al., 2003; Yu-Wai-Man et al., 2009).

Foram estudados 101 pacientes, não relacionados, para verificar a presença e a frequência das três principais mutações primárias da LHON, utilizando o método de restrição enzimática (PCR-RFLP). Nesse rastreamento, 36 indivíduos foram diagnosticados com uma das mutações primárias da LHON, enquanto que 65 pacientes não apresentaram mutações. Dos 36 portadores de mutações, 30 deles possuíam a mutação G11778A e 6 a mutação T14484C. Porém a mutação G3460A não foi localizada em nenhum dos indivíduos analisados. Esse resultado somente confirma o que já foi encontrado na maioria dos estudos realizados em outras partes do mundo, ou seja, a mutação G11778A como maior causa da LHON, seguida da mutação T14484C e da mutação G3460A (Man & Chinnery, 2008; Kodrón et al., 2014). Analisando somente os indivíduos portadores das principais mutações da LHON, a frequência das mutações observada foi de 83.3% para a mutação G11778A e 16.7% para a mutação T14484C. Porém, segundo estudos realizados em outras regiões do mundo a frequência média é de 69% da mutação G11778A, 14% da mutação T14484C e 13% da mutação G3460A (Man & Chinnery, 2008; Yu-Wai-Man et al., 2009). Uma das hipóteses mais aceitáveis para explicar a diferença entre os dados encontrados no estudo e os relatados em outras partes do mundo é a possível influência da origem étnica bastante heterogênea no Brasil. Isto é, a composição da população brasileira, que originalmente foi formada por cruzamentos entre diferentes grupos étnicos (Caucasianos, Africanos e Ameríndios) e que sofreu ao longo do tempo ação de diversas populações imigrantes, pode possuir características mitocondriais distintas em relação às outras populações. Provavelmente, essa importante característica pode contribuir para determinar frequências diferentes entre as mutações, quando comparadas com outras populações ou mesmo dentro da própria população brasileira (Parra et al, 2003).

Analisando somente os dados relacionados à mutação G11778A, a frequência de 83.3% divergiu das encontradas em estudos específicos em outras populações. Essa frequência ficou entre as encontradas na Finlândia (69%) e nas populações asiáticas (95%). Além disso, os 83.3% encontrados no estudo difere da média mundial que é de 69%. No Brasil, a frequência média da mutação G11778A foi de 55%, o que também difere da

encontrada neste estudo (Wallace e Lott, 1993; NEWMAN et al., 1993; Huoponen, 2001; Yu-Wai-Man et al., 2009; Maciel-Guerra et al, 2010; Amaral-Fernandes et al, 2011).

Encontrada em 16.7% dos casos, a mutação T14484C apresentou uma frequência próxima dos 14% relatados na Finlândia e na média das demais populações estudadas. No Brasil, a média da frequência dos dois estudos realizados anteriormente foi de aproximadamente 30%, ou seja, quase o dobro da descrita no presente estudo. No nordeste da Inglaterra e em populações orientais a mutação é considerada pouco frequente. Mas em compensação, é a mutação relacionada à LHON mais frequente em uma população de canadenses descendentes de franceses. Essa frequência é relacionada à ação de um possível efeito fundador. Por isso, pode ser sugerido que um efeito fundador dentro da amostra estudada ou na população brasileira seria suficiente para alterar a frequência das mutações (Macmillan et al. 2000; Yu-Wai-Man et al., 2009; Maciel-Guerra et al, 2010; Amaral-Fernandes et al, 2011).

A mutação primária G3460A não foi encontrada no presente estudo. A ausência da mutação diverge da frequência média de 13% divulgada em outras partes do mundo. Porém, essa ausência é totalmente aceitável quando comparada aos experimentos realizados no Brasil. Prova disso, foi o estudo do perfil clínico e molecular de uma amostra brasileira que identificou apenas um caso com esta mutação. Em outra investigação, que tinha como um dos objetivos determinar a frequência das mutações da LHON no país, a alteração não foi encontrada. Por mais que esses números levem a crer que a mutação não é frequente na população, faz-se necessários mais estudos para confirmar essa hipótese (Yu-Wai-Man et al., 2009; Maciel-Guerra et al, 2010; Amaral-Fernandes et al, 2011).

Se forem analisados apenas os 67 membros do grupo com diagnóstico clínico de LHON, a mutação G11778A foi encontrada em 21 casos (31,4%), a mutação T14484C em 3 indivíduos (4,5%) e 43 pacientes não apresentaram nenhuma mutação (64,1%). Portanto, o estudo molecular foi extremamente útil para confirmar o diagnóstico clínico de LHON em 35,9% dos casos. Já se forem levados em consideração somente os 34 pacientes do Grupo com Neuropatia Óptica de Etiologia à Esclarecer, foram diagnosticados 9 pacientes com a mutação G11778A e 3 com a mutação T14484C, representando, respectivamente, 26,4% e 8,8% dos casos analisados. Não foram encontradas as mutações rastreadas em 22

pacientes, ou seja, 64,7% dos casos. O resultado foi relevante para elucidar a etiologia da neuropatia óptica em 35,3% dos indivíduos.

Foi realizado o rastreamento das mutações primárias raras G3635A, G3700A, G3733A, C4171A, T10663C, G14459A, C14482A, C14482G, A14495G, T14502C e C14568T e das mutações candidatas C4025T, T4160C, T11253C, A11696G, A13637G, G13730A, G14831A, C14898T, G14596A e G15257A em todos os 101 indivíduos. Porém nenhuma das 21 mutações rastreadas foi encontrada. Lembrando que as mutações raras são encontradas em 5% dos portadores da LHON, era esperado que fossem detectados pelo menos alguns indivíduos com alguma mutação. O fato de nenhuma dessas mutações terem sido encontradas pode ser esclarecido por serem consideradas extremamente raras (MAN & CHINNERY, 2008). Exemplo disso são as mutações C4171A e a mutação G14459A que foram descritas como muito raras (Kim et al ; Gropman et al). As mutações G14596A e A11696G têm apenas 11 casos registrados cada 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).

No rastreamento das mutações raras por sequenciamento direto foram encontradas algumas alterações nas regiões rastreadas. Duas dessas alterações estavam em estado de homoplasmia, são elas: a alteração C4167T no gene *MT-ND1* (6 casos) e a alteração T11697C no gene *MT-ND4* (4 pacientes), porém ambas foram consideradas mutações silenciosas (alteração não ocasionou troca de aminoácidos). A alteração G11719A, no gene *MT-ND4*, foi encontrada em 39 pacientes no presente estudo, porém havia sido descrita em 2004 por Saranath e colaboradores em 20 de 24 pacientes com câncer oral e em 20 de 21 indivíduos normais, sendo considerada um polimorfismo (presente em mais de 1% da população). De todos os casos analisados, cinco deles apresentaram o polimorfismo G14560A, no gene *MT-ND6*, que anteriormente foi encontrado em pacientes com câncer de tireóide (Chinnery et al., 2001; Brandon et al., 2006; Giordano et al., 2014). Embora essas alterações tenham sido descritas em pacientes com suspeita de LHON ou em indivíduos com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer, não houve dados na literatura que as relacionasse às doenças estudadas.

As hipóteses mais plausíveis para a ausência de mutações primárias (principais e raras) e mutações candidatas da LHON; Uma hipótese desenvolvida por alguns autores é 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, porém, essa hipótese foi descartada levando como base resultados que serão discutidos alguns parágrafos a frente. 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 uma das que foram descritas como raras segundo alguns autores 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 (Chinnery et al., 2001; Brandon et al., 2006).

A adaptação do método de PRC Multiplex Alelo-Específico foi realizada visando fazer alterações nos reagentes (fabricantes, concentrações e volumes) e nas condições dos ciclos do termociclador (Número de ciclos e tempo das etapas). O intuito inicial era reduzir o tempo das reações e adequá-las às condições utilizadas no Laboratório de Genética Molecular Humana do CBMEG - UNICAMP. O primeiro passo foi utilizar reagentes de fabricantes que geralmente são utilizados no Brasil, já que a metodologia inicial foi inteiramente padronizada na China. Essa etapa foi realizada com sucesso, mas não foi possível reduzir as concentrações dos reagentes, ou seja, a reação teve melhor rendimento quando as concentrações do tampão de PCR, dNTP e *primers* utilizados foram iguais às usadas no método descrito por Bi e colaboradores (2010). O volume da reação também permaneceu inalterado (20µL). A utilização da enzima *Taq DNA Polymerase Brasil* (Invitrogen™ - Life Technologies), em substituição a *TaKaRa rTaq* (Takara Bio Inc., Dalian, China), foi feita de forma confiável somente quando adicionado à reação um dos adjuvantes (BSA e DMSO). As reações que continham o DMSO foram as que apresentaram os melhores resultados. O número de repetições dos ciclos foi abreviado de 30 para 28 e o tempo de uma das etapas (extensão) dentro desses ciclos foi reduzido em apenas 5 segundos (de 35 para 30 segundos). Por mais que essa alteração aparente ser insignificante, o tempo total da reação foi diminuído em 16.7% (15 minutos). Após a padronização, o método foi usado em todos os 101 pacientes selecionados no estudo e nos

100 indivíduos do Grupo Controle negativo, e todos os resultados foram compatíveis aos utilizados em outras técnicas. Além disso, o método se mostrou eficiente, eficaz, de muito fácil reprodutibilidade e relativamente barato, pois não precisa de equipamentos e *kits* incomuns ou caros. Se comparado ao PCR-RFLP, o PCR Multiplex Alelo-Específico leva vantagem por fazer o rastreamento simultâneo das 3 principais mutações da LHON.

A plataforma *TaqMan*[®] *OpenArray Genotyping* foi padronizada com sucesso para o rastreamento das três principais mutações da LHON. Foram selecionados 101 indivíduos, feitos em duplicatas, totalizando 202 reações de genotipagem. Nenhuma das amostras escolhidas apresentou problemas para a realização dos ensaios, ou seja, todas estavam dentro dos padrões exigidos de pureza ($A_{260/280}$ entre 1,7 e 2,0) e concentração (50ng/ μ L). Os resultados alcançados confirmam os dados obtidos por outras técnicas, não apresentando falsos positivos ou falsos negativos. Os índices de sensibilidade e especificidade de ambos os testes foram em torno de 100%. Após a chegada dos *kits* ao Laboratório e a preparação das amostras, todos os testes foram realizados em apenas um dia, o que ilustra a eficiência da técnica. O método mostrou alta reprodutibilidade, uma vez que resulta de um protocolo bem estabelecido, sendo de fácil reprodução por uma pessoa qualificada e minimamente treinada. Uma vez que a padronização das três principais mutações primárias foi realizada de forma segura e confiável, fica claro que seria possível o uso da plataforma para a triagem de todas as principais alterações relacionadas à LHON. Uma placa contendo as principais alterações seria extremamente útil para a obtenção de um diagnóstico molecular rápido, preciso e em larga escala.

A Padronização da plataforma de espectrometria de massa *iPLEX Gold/Maldi TOF MS* (Sequenom Inc.-San Diego, CA) para o rastreamento de onze mutações primárias e detecção dos haplogrupos mitocondriais foi realizado. Foram utilizados nos experimentos todos os 101 casos com hipótese diagnóstica de LHON ou Neuropatia Óptica de Etiologia a Esclarecer e também os 100 pacientes do grupo controle (sem registro clínico de LHON ou neuropatia óptica). Os ensaios mostraram elevado grau de reprodutibilidade e sensibilidade. A concordância perfeita foi observada comparando os dados gerados por esta técnica e os resultados anteriormente obtidos pelos outros métodos. Assim como na plataforma *TaqMan*[®] *OpenArray*[®], não foram encontrados falsos positivos ou falsos negativos. Após

a chegada dos kits, o tempo de preparação das amostras e realização dos experimentos foi em média três dias. Uma grande quantidade de dados foi gerada e todos os resultados foram analisados de forma rápida e não complicada, uma vez que os gráficos gerados pelo software *MassArray*® *Typer 4.0* exibiram padrões de picos de fácil interpretação. Embora, a grande desvantagem do ensaio *Iplex* reside na necessidade de equipamentos específicos, o investimento em uma plataforma *MassArray* pode ser muito atraente para laboratórios e centros de pesquisas com atividades de alto rendimento. Uma vez que segue um protocolo bem estabelecido, a técnica é fácil de ser reproduzida, produzindo grandes quantidades de dados que são simples de serem interpretados. Apesar da limitação de só permitir a identificação de mutações/alterações conhecidas, o método pode oferecer um alto rendimento e uma opção mais flexível para o diagnóstico de muitas alterações em um número elevado de casos.

A plataforma *iPLEX Gold/Maldi TOF MS* (Sequenom Inc.-San Diego, CA) também foi usada para a detecção dos principais haplogrupos mitocondriais. Foram rastreados os 32 marcadores primários dos 25 haplogrupos. Nos 36 pacientes portadores de uma das mutações LHON foram identificados os haplogrupos L1/L2, L3, C, R, D, U e H. Porém analisando somente os indivíduos com a mutação G11778A foi possível identificar os haplogrupos L1/L2 (15 casos), L3 (8 casos), C (3 casos), R (1 caso), D (1 caso) e H (1 caso). Enquanto que os pacientes com a mutação T14484C pertencem aos haplogrupos L1/L2 (2 casos), L3 (3 casos) e U (1 caso). E por fim, os membros do grupo controle negativo apresentaram mais indivíduos com os haplogrupos L1/L2 (35) e L3 (28). Segundo a literatura, indivíduos com as mutações G11778A e T14484C mutações têm um maior risco de perda visual quando encontrados associados ao haplogrupo J, no entanto em nenhum dos casos analisados foi identificado este haplogrupo. O haplogrupo H quando associado à mutação G11778A tende a manifestar a menor expressão da doença, porém no único caso encontrado no estudo, os dados clínicos não confirmam essa afirmativa. Embora os haplogrupos descritos no estudo tenham origem ancestral na Europa (H e L), na Ásia (C, R e D) e na Oceania (R), a maioria dos casos pertence ao macrogrupo L, que tem origem africana (17 casos do L1/L2 e 11 casos do L3) (Torrioni & Wallace, 1994; Herrnstadt et al., 2002; Hudson et al., 2007; Ji et al., 2013; Meng et al., 2014). Nos pacientes onde não foram

encontradas mutações da LHON, os haplogrupos mais frequentes também foram o L1/L2 e o L3. O mesmo resultado foi encontrado no grupo controle sem diagnóstico clínico de LHON ou neuropatia óptica. Estes resultados não são surpreendentes, considerando a elevada contribuição dos africanos para a formação da população brasileira, que pode ser de até 40% em algumas regiões (Parra et al., 2003). Até o momento, não existem estudos que descrevam o envolvimento dos haplogrupos L1/L2 e L3 no aumento, ou diminuição, do risco de expressão da LHON. A comparação dos resultados dos haplogrupos encontrados nos pacientes com uma das mutações e dos haplogrupos dos indivíduos sem alterações relacionadas à LHON, deixa claro que não é possível determinar uma correlação mais precisa entre as mutações e o haplogrupos encontrados neste estudo. Por isso, a sugestão de novos estudos com um grupo maior de indivíduos é bem aceitável.

Um experimento paralelo foi realizado para verificar a sensibilidade da plataforma *iPLEX Gold/Maldi TOF MS* na detecção de baixas taxas de heteroplasmia. De acordo com o fabricante, a plataforma é capaz de detectar taxas de heteroplasmia em torno de 10% de mtDNA mutante. De fato, os experimentos realizados no presente estudo para verificar a sensibilidade desta tecnologia confirma esta afirmação, ou seja, foram detectadas taxas de no mínimo 10% de mtDNA das mutações G11778A e T14484C. No entanto, observou-se também que a plataforma deve ser usada qualitativamente porque, embora a precisão absoluta para detectar níveis baixos de mtDNA mutante foi registrado em todos os experimentos, não foi possível estabelecer uma relação quantitativa entre a intensidade dos picos e as quantidades de mtDNA mutante usados. Uma vez que existem casos raros em que os pacientes com mutações da LHON manifestam a doença com menos que 50% de mtDNA mutante, este método parece ser altamente eficiente na detecção de doença (Jacobi et al. 2001; Chinnery et al, 2001). Por isso, é possível afirmar que todas as mutações foram encontradas estavam em estado homoplásmico no sangue periférico.

Os éxons 1, 2, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 26 e 27 do gene *OPA1* foram sequenciados para a detecção de alterações que apresentassem relação com a Atrofia Óptica Autossômica Dominante, a ADOA. Apesar do rastreamento desses 10 éxons, não foram encontradas mutações/alterações relacionadas à doença. O fato de não terem sido encontradas mutações relacionadas à ADOA não terem sido encontradas pode ser atribuídas a outras alterações,

descritas ou até desconhecidas, localizadas em regiões não analisadas no presente estudo. Outra teoria é, assim como a elaborada para tentar explicar os 65% dos casos não elucidados no pacientes da LHON, que os indivíduos analisados sejam portadores de outra doença com sintomas clínicos muito semelhantes à ADOA.

Durante o sequenciamento dos éxons do gene *OPA1*, foram encontradas outras alterações, principalmente nas regiões intrônicas entre os éxons estudados. Exemplos disso são os polimorfismos rs10451941 (41 casos), rs166850 (49 indivíduos) e rs76253392 (1 paciente), todos encontrados na região intrônica localizada entre os éxons 8 e 9. Desses casos citados, 34 deles possuem os polimorfismos rs10451941 e rs166850 simultaneamente, e um caso apresenta os três polimorfismos ao mesmo tempo. Os polimorfismos rs10451941 e rs166850 possuem relação com indivíduos com glaucoma de tensão normal (Aung et al, 2002; Yu-Wai-Man et al, 2010; Skidd et al., 2013). Na região intrônica entre os éxons 12 e 13 foi encontrado o polimorfismo rs73205350, em um único caso. O polimorfismo rs34222475, na região intrônica entre os éxons 15 e 16, foi a única alteração encontrada em 2 casos. Mas como citado anteriormente, segundo dados da literatura, nenhuma dessas alterações tem relação direta ou indireta com a ADOA.

O presente estudo foi de extrema importância por fazer análise molecular detalhada da Neuropatia Óptica Hereditária de Leber e da Atrofia Óptica Autosômica Dominante em uma amostra de 101 pacientes brasileiros. A população brasileira tem poucos estudos relacionados à frequência das mutações da LHON e da ADOA, e todos eles foram realizados com um número baixo de casos, por isso um estudo que tem como casuística 101 pacientes merece ser destacado. Além disso, outros pontos que merecem ser evidenciados são a otimização e padronização de técnicas e metodologias que podem ser usadas futuramente (para poucos casos ou em larga escala) no rastreamento dos haplogrupos mitocondriais e das principais alterações relacionadas à LHON e à ADOA. Esses métodos se mostraram eficazes, eficientes e de fácil reprodutibilidade. Por fim, apesar de não terem sido detectadas mutações raras ou não descritas, um dos pontos mais relevantes foi a confirmação e elucidação de aproximadamente 35% dos casos estudados. Por isso, novos estudos se fazem necessários, não somente para elucidar a etiologia dos 65% dos indivíduos em que não foram encontradas alterações, mas principalmente para

responder questões latentes que permanecem obscuras em relação à LHON e à ADOA no Brasil.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

I - As frequências das mutações primárias da LHON G11778A e T14484C foram diferentes das encontradas em outras partes do mundo, com 83.3% e 16.7%, respectivamente;

II - Não foi encontrada a mutação primária G3460A;

III - O método de PCR Multiplex Alelo-Específico foi otimizado e mostrou eficiência e eficácia no rastreamento das mutações primárias da LHON;

IV - A plataforma *TaqMan® OpenArray® Genotyping* foi padronizada e se mostrou um método confiável não somente para o rastreamento das mutações primárias, mas para futuros estudos envolvendo um número maior de alterações;

V - A plataforma *iPLEX Gold/Maldi TOF MS* foi extremamente útil para o rastreamento das principais mutações da LHON e dos seus haplogrupos, com a vantagem de detectar até o mínimo de 10% de DNA mutante;

VI - Nenhuma das 21 mutações raras da LHON foi encontrada no estudo;

VII - Os haplogrupos detectados têm origem na Europa, Ásia e Oceania, e principalmente na África, mas não apresentaram correlação com a expressividade da doença;

VIII - Não foram encontradas mutações no gene nuclear *OPA1*.

IX - Foram confirmados por testes moleculares 35% dos casos de indivíduos com diagnóstico clínico de LHON e elucidados 35% dos indivíduos diagnosticados com neuropatia óptica de etiologia a esclarecer.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHILLI A, IOMMARINI L, OLIVIERI A, PALA M, KASHANI B (2012). "Rare primary mitochondrial DNA mutations and synergistic variants in Leber's Hereditary Optic Neuropathy". PLoS ONE 7(8):e42242.

AITULLINA A, BAUMANE K, ZALITE S, RANKA R, ZOLE E, POLE I, SEPETIENE S, LAGANOVSKA G, BAUMANIS V, PLISS L. Point mutations associated with Leber hereditary optic neuropathy in a Latvian population. Molecular Vision 2013 Nov 21;19:2343-51. eCollection 2013.

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.

ALEXANDER, C., VOTRUBA, M., PESCH, U. E. A., THISELTON, D. L., MAYER, S., MOORE, A., RODRIGUEZ, M., KELLNER, U., LEO-KOTTLER, B., AUBURGER, G., BHATTACHARYA, S. S., WISSINGER, B. *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nature Genet.

AMARAL-FERNANDES MS, MARCONDES AM, MIRANDA PMAD, MACIEL-GUERRA AT, SARTORATO EL. Molecular Vision 2011;17:3175-9. Epub 2011 Dec 7.

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.

AUBURGER, G., BHATTACHARYA, S. S.; WISSINGER, B. *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nature Genet 2000.

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_arttext&pid=S1516-44462003000600003&lng=pt&nrm=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. Journal Neurology Neurosurg Psychiatry 2004 75(12):1731-6.

BEAL, M.F. Aging , energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annual Neurology38:357-66, 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. European Journal Human Genetics 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.

CANN RL. Genetic clues to dispersal in human populations: retracing the past from the present. Science. 2001;291:1742-48.

CARELLI V, ACHILLI A, VALENTINO ML, RENGO C, SEMINO O, PALA M et al. Haplogroup effects and recombination of mitochondrial DNA: novel clues from the analysis of Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *American Journal Human Genetics* 2006; 78, 564-74.

CARLSON, N; KURTZ, D.; HEATH, D.; HINES, C. *Clinical Procedures for Ocular Examination*. Appleton & 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_arttext&pid=S0034-2992002000200018&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 27 nov. 2008. doi: 10.1590/S0034-72992002000200018.

CHAMPE PC., HARVEY, RA. *Bioquímica ilustrada*, 2^a 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.

CHEVROLLIER, A., GUILLET, V., LOISEAU, D., GUEGUEN, N., DE CRESCENZO, M.-A. P., VERNY, C., FERRE, M., DOLLFUS, H., ODENT, S., MILEA, D., GOIZET, C., AMATI-BONNEAU, P., PROCACCIO, V., BONNEAU, D., REYNIER, P. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann. Neurol.* 63: 794-798, 2008.

CHINNERY P.F, ANDREWS R.M., TURNBULL D.M., HOWELL N.N. Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation?, *Am J Med Genet.* 2001;98:235-43.

CHINNERY PF, ANDREWS RM, TURNBULL DM, HOWELL N. Leber hereditary optic neuropathy: does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? *American Journal of Medical Genetics.* 2001;98:235-43.

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. & 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. & 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. American Journal Human Genetics 1996;58:703-11.

DELETTRE, C; LENAERS, G; GRIFFOIN, JM; GIGAREL, N; LORENZO, C; BELENGUER, P; PELLOQUIN, L; GROSGEORGE, J; TURC-CAREL, C; PERRET, E; ASTARIE-DEQUEKER, C; LASQUELLEC, L; ARNAUD, B; DUCOMMUN, B; KAPLAN, J; HAMEL, CP (October 2000). "Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy". Nature genetics 26 (2): 207-10. doi:10.1038/79936. PMID 11017079.

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

DUDKINA NV, EUBEL H, KEEGSTRA W, BOEKEMA EJ, BRAUN HP. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102:3225-9.

eOPA Database - Disponível em <http://lbbma.univ-angers.fr/lbbma.php?id=22&type=m> - Acessado em junho 2011.

eOPA Database - Disponível em <http://lbbma.univ-angers.fr/lbbma.php?id=22&type=m> - Acessado em abril 2011.

eOPA Database - Disponível em <http://lbbma.univ-angers.fr/lbbma.php?id=22&type=m> - Acessado em dezembro 2010.

Espirito Santo AF, Simões C, Steinicke GO, Saito SH. Óptica do olho Humano. Metodologia do Ensino de Física I. 2010.

Ferre M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dollfus H et al. Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel *OPA1* mutations. Hum Mutat 2009; 30: E692-E705.

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. American Journal Ophthalmology. 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.

GIORDANO C1, IOMMARINI L, GIORDANO L, MARESCA A, PISANO A, VALENTINO ML, CAPORALI L, LIGUORI R, DECEGLIE S, ROBERTI M, FANELLI F, FRACASSO F, ROSS-CISNEROS FN, D'ADAMO P, HUDSON G, PYLE A, YU-WAI-MAN P, CHINNERY PF, ZEVIANI M, SALOMAO SR, BEREZOVSKY A, BELFORT R JR, VENTURA DF, MORAES M, MORAES FILHO M, BARBONI P, SADUN F, DE NEGRI A, SADUN AA, TANCREDI A, MANCINI M, D'AMATI G, LOGUERCIO POLOSA P, CANTATORE P, CARELLI V. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain. 2014 Feb;137(Pt 2):335-53.

GRAY, H. & 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 . *Revista Neurologia* 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. *Annual Neurology*. 2002 52(5):534-42.

GUYTON, ARTHUR C. E HALL, JOHN E., *Tratado de Fisiología 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. *American Journal Human Genetics*. 1995 57(1):77-86.

HERRNSTADT C, ELSON JL, FAHY E, PRESTON G, TURNBULL DM, ANDERSON C. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *American Journal of Human Genetics*. 2002;70:1152-71.

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. *American Journal Human Genetics*1991;48:935-42.

HOWELL N, MACKEY DA. Low-penetrance branches in matrilineal pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *American Journal Human Genetics*. 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

HOYT CS. Autosomal dominant optic atrophy. A spectrum of disability. *Oph-thalmology* 1980;87:245-51.

HUDSON G, CARELLI V, SPRUIJT L, GERARDS M, MOWBRAY C, ACHILLI A. Clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy is affected by the mitochondrial DNA-haplogroup background. *American Journal of Human Genetics*. 2007;81:228-33.

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 15 dez. 2012

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo demográfico 2010 Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home> >. Acessado em 25 fev. 2014

JACOBI FK, LEO-KOTTLER B, MITTELVIEFHAUS K, ZRENNER E, MEYER K, PUSCH KM, B WISSINGER. Segregation patterns and heteroplasmy prevalence in Leber's hereditary optic neuropathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 (2001), pp. 1208-1214

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.

JI Y, LIANG M, ZHANG J, ZHANG M, ZHU J, MENG X, ZHANG S, GAO M, ZHAO F, WEI QP, JIANG P, TONG Y, LIU X, QIN MO J, GUAN MX. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the LHON-associated ND1 G3460A mutation in Chinese families. *J Hum Genet*. 2014 Mar;59(3):134-40. doi: 10.1038/jhg.2013.134. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24430572

JI Y, ZHANG A-M, JIA X, ZHANG Y-P, XIAO X, LI S. Mitochondrial DNA haplogroups M7b1'2 and M8a affect clinical expression of leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m.11778G→A mutation. *American Journal Human Genetics*. 2008;83:760-8.

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

KAEWSUTTHI S, PHASUKKIJWTANA N, JOYJINDA Y, CHUENKONGKAEW W, KUNHAPAN B, ET AL. Mitochondrial haplogroup background may influence Southeast Asian G11778A Leber hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:4742-8.

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. *Annual Neurology.* 2000 Jul;48(1):102-4

KJER P. Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance. A clinical and genetic study of 19 Danish families. *Acta Ophthalmol (Copenh.)* 1959;37(54 Suppl):1-146.

KODROŃ A, KRAWCZYŃSKI MR, TOŃSKA K, BARTNIK E. m.3635G>A mutation as a cause of Leber hereditary optic neuropathy. *Journal Clinical Genetics.* 2014 Jul;67(7):639-41. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202192. Epub 2014 Apr 19. PMID: 24747208

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. *Annual Neurology.* 2002 52(5):529-30.

LEBER T. Uber hereditare 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., LUBERICHS, 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.

LIGUORI M. A phenotypic variation of dominant optic atrophy and deafness (ADOAD) due to a novel *OPA1* mutation. *Journal of Neurology*. 2008;255:127-129.

MACIEL-GUERRA AT, ZANCHETTA LM, AMARAL FERNANDES MS, ANDRADE PB, MIRANDA PMAD, SARTORATO EL. Leber's Hereditary Optic Neuropathy: Clinical and molecular profile of a Brazilian sample. *Ophthalmic Genet* 2010;31:126-128.

MACKEY D.A., Trounce I. Genetics: optic nerve genetics-more than meets the eye. *Nature Reviews Neurology*.2010;6:357-358.

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. *American Journal Human Genetics*. 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. *American Journal Human Genetics*. 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

MENG X, ZHU J, GAO M, ZHANG S, ZHAO F, ZHANG J, LIU X, WEI Q, TONG Y, ZHANG M, QU J, GUAN M, CHUAN Y. The analysis of mitochondrial DNA haplogroups and variants for Leber's hereditary optic neuropathy in Chinese families carrying the m.14484T >C mutation. Chinese. 2014 Apr;36(4):336-45.

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.

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

MITODYN.ORG DATABASE *OPA1* - Disponível em
http://mitodyn.org/home.php?select_db=OPA1 - Acessado 23 de janeiro de 2014

MITODYN.ORG DATABASE *OPA1* - Disponível em
http://mitodyn.org/home.php?select_db=OPA1 - Acessado 11 de julho de 2014

MITODYN.ORG DATABASE *OPA1* - Disponível em
http://mitodyn.org/home.php?select_db=OPA1 - Acessado 25 de julho de 2014

MITOMAP - A Human Mitochondrial Genome Database. Available:
<Http://www.mitomap.org> Accessed 2012 Mar 2. Derbeneva 2009

MITOMAP - A Human Mitochondrial Genome Database. Primary Haplogroup Markers. Available in <http://mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupFreqs> - Accessed December 18, 2011.

MITOMAP - Human Mitochondrial Genome Database. Primary Haplogroup Markers. Available in <http://mitomap.org/MITOMAP/HaplogroupFreqs> - Accessed December 1, 2013.

MITOMAP. A Human Mitochondrial Genome Database. Available: <http://www.mitomap.org> Accessed 2012 Mar 2.

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. *American Journal Ophthalmology.* 1991 111(6):750-62.

NEWMAN NJ. From genotype to phenotype in Leber hereditary optic neuropathy: still more questions than answers. *J Neuroophthalmol.* 2002;22:257-61.

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. In: Dufier J-L, editor. *Orphanet Encyclopedia* [monograph on the Internet]. [Update 2003 Nov; cited 2011 Set 1]. Available from: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-OA.pdf>

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

PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JC, ROCHA J, ANTUNES CM, PENA SD. Color and genomic ancestry in Brazilians, *ProcNatlAcadSci U S A.* (2003) Jan 7;100(1):177-82.

PAYNE M., YANG Z.L., KATZ B.J., WARNER J.E.A., WEIGHT C.J., ZHAO Y. Dominant optic atrophy, sensorineural hearing loss, ptosis, and ophthalmoplegia: a syndrome caused by a missense mutation in *OPA1*. *American Journal of Ophthalmology*. 2004;138:749-755.

PFEFFER G1, BURKE A, YU-WAI-MAN P, COMPSTON DA, CHINNERY PF. Clinical features of MS associated with Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations. *Neurology*. 2013 Dec 10;81(24):2073-81. doi: 10.1212/01.wnl.0000437308.22603.43. Epub 2013 Nov 6.

PUOMILA A, HAMALAINEN P, KIVIOJA S, SAVONTAUS ML, KOIVUMAKI S, HUOPONEN K, NIKOSKELAINEN E. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *European Journal Human Genetics* 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

QU J, WANG Y, TONG Y, et al. Leber's hereditary optic neuropathy affects only female matrilineal relatives in two Chinese families. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4906-12.

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&nrm=iso>. access on 30 Dec. 2009. doi: 10.1590/S0042-96862004001100009.

REZVANI Z, DIDARI E, ARASTEHKANI A, GHODSINEJAD V, ARYANI O, KAMALIDEHGHAN B, HOUSHMAND M. Fifteen novel mutations in the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1, 2, 3, 4, 4L, 5 and 6 genes from Iranian patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON). *Mol Biol Rep*. 2013 Dec;40(12):6837-41. doi: 10.1007/s11033-013-2801-2. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24158608

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_arttext&pid=S0004-

27492006000400005&lng=en&nrm=iso>. access on 30 Dec. 2009. doi: 10.1590/S0004-27492006000400005.

ROMERO P, FERNÁNDEZ V, SLABAUGH M, SELEME N, REYES N, GALLARDO P, HERRERA L, PEÑA L, PEZO P. Pan-American mDNA haplogroups in Chilean patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *M. Molecular Vision* 2014 Mar 14;20:334-40. PMID:24672219

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

SADUN A.A., CARELLI V., SALOMAO S.R., BEREZOVSKY A., QUIROS P.A., SADUN F. Extensive investigation of a large Brazilian pedigree of 11778/haplogroup J Leber hereditary optic neuropathy. *American Journal of Ophthalmology.*2003;136:231-238. [PubMed]

SADUN A.A., MARTONE J.F., MUCIMENDOZA R., REYES L., DUBOIS L., SILVA J.C. Epidemic optic neuropathy in Cuba - eye findings. *Archives of Ophthalmology.* 1994;112:691-699. [PubMed]

SADUN A.A., SALOMAO S.R., BEREZOVSKY A., SADUN F., DENEGRI A.M., QUIROS P.A. Subclinical carriers and conversions in Leber hereditary optic neuropathy: a prospective psychophysical study. *Transactions of American Ophthalmological Society.* 2006;104:51-61. [PMC free article] [PubMed]

SADUN A.A., WIN P.H., ROSS-CISNEROS F.N., WALKER S.O., CARELLI V. Leber's hereditary optic neuropathy differentially affects smaller axons in the optic nerve. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2000;98:223-232. discussion 232-5. [PMC free article] [PubMed]

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. *American Journal Ophthalmology.* 2003;136(2):231-8.

SALLUM JMF, FARAH ME, MAUMENEE IH. Heterogeneidade genética em atrofia óptica autossômica dominante. *Arq. Bras. Oftalmol., São Paulo, v. 65, n. 4, Aug. 2002 .* Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-

27492002000400005&lng=en&nrm=iso>. access on 14 Sept. 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492002000400005>.

SALLUM, J.M.F.; FARAH, M.E; Maumenee, Irene Hussels. Heterogeneidade genética em atrofia óptica autossômica dominante. Arq. Bras. Oftalmol., São Paulo, v. 65, n. 4, Aug. 2002 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492002000400005&lng=en&nrm=iso>. access on 14 Sept. 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27492002000400005>.

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.

SHAFI SHARIAT PM, HOUSHMAND M, TABASSI AR. Mitochondrial D-loop variation in leber hereditary neuropathy patients harboring primary G11778A, G3460A, T14484C mutations: J and W haplogroups as high-risk factors. Arch Med Res. 2006;37:1028-1033.

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

SHIMIZU S., MORI N., KISHI M., SUGATA H., TSUDA A., KUBOTA N. A novel mutation in the *OPA1* gene in a Japanese patient with optic atrophy. American Journal of Ophthalmology. 2003;135:256-257. [PubMed]

SIMON DK, FRIEDMAN J, BREAKFIELD XO, JANKOVIC J, BRIN MF, PROVIAS J, BRESSMAN SB, CHARNESS 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. Situação mundial da visão - Visão 2020: o direito de ver - 1999-2005

SKIDD PM, LESSELL S, CESTARI DM. Autosomal dominant hereditary optic neuropathy (ADOA): a review of the genetics and clinical manifestations of ADOA and ADOA+. Semin Ophthalmol. 2013 Sep-Nov;28(5-6):422-6. doi: 10.3109/08820538.2013.825296. Review.

SMITH KH, JOHNS DR, HEHER KL, MILLER NR. Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. Arch Ophthalmol. 1993;111:1486-90.

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. & 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=news&news_id=643&action=read&eid=185

SPINAZZI M., CAZZOLA S., BORTOLOZZI M., BARACCA A., LORO E., CASARIN A. A novel deletion in the GTPase domain of *OPA1* causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function. Human Molecular Genetics. 2008;17:3291-3302.

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. American Journal Ophthalmology. 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, SURATA 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. *American Journal Human Genetics.* 1997 60(5):1107-21.

TORRONI A, WALLACE DC. Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 1994;26:261-71.

TORRONI A, WALLACE DC. Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 1994;26:261-71.

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. *Annual Neurology.* 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.

VOTRUBA M, FITZKE FW, HOLDER GE, CARTER A, BHATTACHARYA SS, MOORE AT. Clinical features in affected individuals from 21 pedigrees with dominant optic atrophy. [commented on Arch Ophthalmol 1999;117:287-8]. Arch Ophthalmol 1998;116:351-8.

VOTRUBA M., MOORE A.T., BHATTACHARYA S.S. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. Journal of Medical Genetics. 1998;35:793-800. [PMC free article] [PubMed]

VOTRUBA M., THISELTON D., BHATTACHARYA S.S. Optic disc morphology of patients with *OPA1* autosomal dominant optic atrophy. British Journal of Ophthalmology. 2003;87:48-53. [PMC free article] [PubMed]

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 et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science. 1988;242(4884):1427-30.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Universal eye health: a global action plan 2014-2019. Eye diseases - prevention and control. 2.Vision disorders. 3.Blindness. 4.Health planning.

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. Leber Hereditary Optic Neuropathy. GeneClinics, University of Washington LHON online review October 2000, March 2008.

YU-WAI-MAN P, CHINNERY PF. Dominant optic atrophy: novel *OPA1* mutations and revised prevalence estimates. Ophthalmology. 2013 Aug;120(8):1712-1712.e1. PMID: 23916084

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

YU-WAI-MAN P., GRIFFITHS PG, BURKE A, SELLAR PW, CLARKE MP, GNANARAJ L, AH-KINE D, HUDSON G, CZERMIN B, TAYLOR RW, HORVATH R, CHINNERY PF. The Prevalence and Natural History of Dominant Optic Atrophy Due to *OPA1* Mutations. Ophthalmology, Volume 117, Issue 8, August 2010, Pages 1538-1546.e1

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

ANEXO 1



Comitê de Ética Em Pesquisa
Universidade Estadual de Campinas

<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa/comite-de-etica-em-pesquisa>

CEP, 29/04/14.
(PARECER CEP: N° 690/2004)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

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

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Luciene Maria Zanchetta

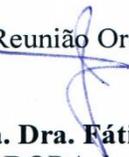
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o adendo que inclui o subprojeto “ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES ASSOCIADAS À NEUROPATIA ÓPTICA”, com finalidade de doutorado do aluno Paulo Maurício do Amôr Divino Miranda, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

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

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 29 de abril de 2014.


Prof. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2

Tabela 16 - Alterações no gene *OPAI* que poderiam ser encontradas no presente estudo.

Éxon	Alteração (cDNA)	Tipo	Referência
1	c.6G>A	Substituição	Pesch et al. (2001)
1	c.22G>T	Substituição	Han et al. (2006)
1	c.1+97G>A	Substituição	Han et al. (2006)
1	c.15-33C>T	Substituição	Han et al. (2006)
1	c.26+12T>G	Substituição	Han et al. (2006)
2	c.321G>A	Substituição	Pesch et al. (2001)
2	c.113_130del	Deleção	Thiselton et al. (2002)
2	c.239A>G	Substituição	Han et al. (2006)
2	c.181C>T	Substituição	Nakamura et al. (2006)
2	c.190del	Deleção	Ferre et al. (2009)
2	c.154C>T	Substituição	Ban et al. (2007)
2	c.284C>T	Substituição	Ferre et al. (2009)
2	c.305A>G	Substituição	Ferre et al. (2009)
2	c.112C>T	Substituição	Nakamura et al. (2006)
2	c.344C>T	Substituição	Yu-Wai-Man et al. (Brain, 2010)
2	c.27-5C>T	Substituição	Han et al. (2006)
8	c.800_803del	Deleção	Baris et al. (2003)
8	c.800_801del	Deleção	Toomes et al. (2001)
8	c.794C>A	Substituição	Pesch et al. (2001)
8	c.893T>A	Substituição	Ferre et al. (2009)
8	c.830T>C	Substituição	Ferre et al. (2009)
8	c.796_799del	Deleção	Cohn et al. (2007)
8	c.804_805del	Deleção	Yu-Wai-Man et al. (2010)
8	c.6-13T>G	Substituição	Han et al. (2006)
9	c.852T>A	Substituição	Galvez-Ruiz et al. (2013)
9	c.898A>T	Substituição	Thiselton et al. (2002)
9	c.868C>T	Substituição	Puomila et al. (2005)
9	c.889G>T	Substituição	Puomila et al. (2005)
9	c.949-2A>T	Substituição	Galvez-Ruiz et al. (2013)
9	c.956+49_957-51del	Deleção	Thiselton et al. (2002)
9	c.949-1G>A	Substituição	Ferre et al. (2009)
12	c.1183del	Deleção	Alexander et al. (2000)
12	c.1204G>T	Substituição	Yamada et al. (2003)
12	c.1230+18A>G	Substituição	Thiselton et al. (2002)
12	c.1230+3A>C	Substituição	Pesch et al. (2001)
12	c.1230+2T>C	Substituição	Puomila et al. (2005)
12	c.1230+2T>G	Substituição	Kim et al. (2005)

Tabela 16 – CONTINUAÇÃO

Éxon	Alteração (cDNA)	Tipo	Referência
13	c.1261C>T	Substituição	Alexander et al. (2000)
13	c.1261C>A	Substituição	Delettre et al. (2001)
13	c.1237_1258del	Deleção	Pesch et al. (2001)
13	c.1305G>A	Substituição	Schimpf et al. (2006)
13	c.1234G>A	Substituição	Ferre et al. (2009)
13	c.1291A>G	Substituição	Cohn et al. (2007)
13	c.1236A>G	Substituição	Yu-Wai-Man et al. (Brain, 2010)
13	c.1305+1G>A	Substituição	Baris et al. (2003)
13	c.1305+5G>C	Substituição	Ferre et al. (2009)
13	c.1305+1G>T	Substituição	Almind et al. (2012)
13	c.1334G>A	Substituição	Almind et al. (2012)
15	c.1417_1418del	Deleção	Baris et al. (2003)
15	c.1461_1463del	Deleção	Alexander et al. (2000)
15	c.1469_1470del	Deleção	Thiselton et al. (2002)
15	c.1453A>G	Substituição	Ferre et al. (2009)
15	c.1450_1455del	Deleção	Ferre et al. (2009)
15	c.1477+32A>G	Substituição	Thiselton et al. (2002)
15	c.1478-1G>A	Substituição	Ferre et al. (2009)
16	c.1574A>G	Substituição	Baris et al. (2003)
16	c.1519del	Deleção	Alexander et al. (2000)
16	c.1478A>T	Substituição	Pesch et al. (2001)
16	c.1567A>G	Substituição	Pesch et al. (2001)
16	c.1499G>A	Substituição	Shimizu et al. (2002)
16	c.1478A>G	Substituição	Dadgar et al. (2006)
16	c.1480_1483del	Deleção	Ferre et al. (2009)
16	c.1511C>G	Substituição	Ferre et al. (2009)
16	c.1552_1557dup	Duplicação	Ferre et al. (2009)
16	c.1481G>T	Substituição	Liguori et al. (2008)
16	c.1575_1608+4del	Deleção	Spinazzi et al. (2009)
16	c.1492G>A	Substituição	Yu-Wai-Man et al. (Brain, 2010)
16	c.1577T>C	Substituição	Mavrogiannis LA, Joss S, Charlton RS (unpublished)
16	c.1478A>C	Substituição	Almind et al. (2012)
16	c.1510A>C	Substituição	Liskova et al. (2013)
16	c.1541G>A	Substituição	Almind et al. (2012)
16	c.1608+23G>A	Substituição	Pesch et al. (2001)
16	c.1609-75T>C	Substituição	Delettre et al. (2001)
16	c.1609-179G>A	Substituição	Puomila et al. (2005)
16	c.1609-1G>C	Substituição	Ferre et al. (2009)

Tabela 16 – CONTINUAÇÃO

Éxon	Alteração (cDNA)	Tipo	Referência
16	c.1609-1G>T	Substituição	Ferre et al. (2009)
26	c.2531del	Deleção	Baris et al. (2003)
26	c.2635C>T	Substituição	Ferre et al. (2009)
26	c.2633C>A	Substituição	Ferre et al. (2009)
26	c.2521-?_2661+?del	Deleção	Fuhrmann et al. (2009)
26	c.2661G>C	Substituição	Almind et al. (2012)
26	c.2661+2T>C	Substituição	Ferre et al. (2009)
26	c.2661+1G>T	Substituição	Ferre et al. (2009)
26	c.2661+4A>G	Substituição	Ferre et al. (2009)
26	c.2661+4_2661+5delin sGTAAC	Inserção/Deleção	Almind et al. (2012)
27	c.2675G>A	Substituição	Puomila et al. (2005)
27	c.2687A>G	Substituição	Han et al. (2006)
27	c.2702dup	Duplicação	Nakamura et al. (2006)
27	c.2708delTTAG	Duplicação	Nakamura et al. (2006)
27	c.2755dup	Duplicação	Nakamura et al. (2006)
27	c.2755C>T	Substituição	Ferre et al. (2009)
27	c.2734C>T	Substituição	Ferre et al. (2009)
27	c.2778+1G>A	Substituição	Toomes et al. (2001)
27	c.2779-142T>C	Substituição	Thiselton et al. (2002)
27	c.2779-112A>G	Substituição	Thiselton et al. (2002)
27	c.2778+2T>A	Substituição	Kim et al. (2005)
27	c.2779-9A>G	Substituição	Schimpf et al. (2006)
27	c.2779-1G>A	Substituição	Ferre et al. (2009)
27	c.2778+1G>C	Substituição	Pesch et al. (2001)
1 a 29	c.1-?_2983+?del	Deleção	Fuhrmann et al. (2009)
1 a 30	c.1-?_3048+?del	Deleção	Fuhrmann et al. (2009)
1 a 6	c.1-?_678+?del	Deleção	Fuhrmann et al. (2009)
2 a 29	c.33-?_2983+?dup	Duplicação	Mavrogiannis LA, Prescott K, Charlton RS (unpublished)
4 a 10	c.449-?_1035+?dup	Duplicação	Mavrogiannis LA, Robertson L, Charlton RS (unpublished)
9 a 11	c.844-?_1149+?dup	Duplicação	Fuhrmann et al. (2009)

Modificado de MitoDyn.org Database

Disponível em http://mitodyn.org/home.php?select_db=OPA1 - Acessado 16 de julho de 2014

