DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Investigação do *Cross-talk* Genómico na Neuropatia Ótica Hereditária de Leber

Tânia Sofia Silva Sousa

2012

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Investigação do *Cross-talk* Genómico na Neuropatia Ótica Hereditária de Leber

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Manuela Grazina (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), co-orientação do Doutor Filipe Silva (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e supervisão do Professor Doutor António Portugal (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Tânia Sofia Silva Sousa

2012

Copyright© Tânia Sousa e Manuela Grazina, 2012.

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e do orientador científico e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada e autorização.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and scientific supervisor and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgment and authorization.

Agradecimentos

Gostaria de deixar o meu sincero agradecimento a todos os que contribuíram e tornaram possível a realização deste trabalho:

À Professora Doutora Manuela Grazina, minha orientadora, por me ter proporcionado a realização desta etapa crucial do meu percurso académico. Agradeço-lhe também o incentivo e a partilha de conhecimentos que me permitiram crescer cientificamente;

Ao meu co-orientador, Doutor Filipe Silva, pela ajuda fundamental que me prestou ao longo da realização deste projeto e pelos conhecimentos que me transmitiu;

Ao Professor Doutor António Portugal por ter aceite ser meu orientador interno da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e pela disponibilidade que sempre demonstrou;

À Professora Doutora Catarina Resende de Oliveira, pela oportunidade de integrar o CNC/UC.

A todos os elementos do Laboratório de Bioquímica Genética pelo auxílio prestado na realização deste trabalho. O meu obrigado especial à Mestre Carolina Ribeiro e ao Dr. João Pratas por toda a ajuda prestada ao longo da execução do trabalho laboratorial, essencial à elaboração desta dissertação. Um especial agradecimento também à Daniela Luís por todas as dúvidas que prontamente me esclareceu;

A todos os meus amigos, em especial à Catarina, Sabrina e mais uma vez à Daniela pela companhia, apoio e amizade que contribuíram para a concretização deste trabalho. À Tânia e à Joana por estarem sempre presentes;

Ao Cyril por estar sempre ao meu lado e por todo o apoio que me deu, em especial durante esta etapa;

Por último, e em especial, aos **meus pais** e **irmã,** o meu enorme e sincero obrigado por me proporcionarem alcançar os meus objetivos e por todo o apoio incondicional ao longo deste percurso e em todos os aspetos da minha vida.

Índice

Índice de figuras iv

Índice de tabelas vi

Lista de abreviaturas viii

Glossário de termos clínicos xii

Resumo xiv

Abstract xvi

1. Introdução 1

1.1. Doenças mitocondriais 2

1.1.1. O genoma mitocondrial e as doenças mitocondriais 3

1.1.2. Doenças mitocondriais de origem nuclear 7

1.1.3. Doenças devidas a defeitos na comunicação bigenómica 8

1.2. Atrofias óticas 9

1.2.1. Neuropatia ótica hereditária de Leber 10

1.2.1.1. Caracterização clínica 10

1.2.1.2. Causas genéticas 13

1.2.1.3. Mecanismos fisiopatológicos 17

1.3. Gene *OPA1* 20

1.4. Gene *OPA3* 25

2. Objetivos 28

3. Material e métodos 30

3.1. Amostragem 31

3.1.1. Família 1 31

3.1.2. Controlos 32

3.1.3. Doentes com LHON 32

3.2. Análise da sequência dos genes *OPA1* e *OPA3* 32

3.2.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR) 32

3.2.2. Eletroforese em gel de agarose 35

3.2.3. Purificação dos produtos da PCR 36

3.2.4. Sequenciação dos fragmentos de DNA 37

3.3. Análise *in silico* 40
3.3.1. Análise de patogenicidade 40
3.3.2. Conservação evolutiva 41
3.3.3. Análise de alteração de *splicing* 41
3.4. Análise de variações de sequência no gene *OPA1* 42
3.4.1. PCR-RFLP 42
3.5. Análise estatística 43
4. Resultados 45
4.1. Análise genética do gene *OPA1* 46
4.1.1. Sequenciação do gene *OPA1* 46
4.1.2. Análise *in silico* 50
4.1.2.1. Conservação evolutiva 50
4.1.2.2. Previsão da patogenicidade 51
4.1.2.3. Previsão da alteração do *splicing* 52
4.1.3. Análise de variações de sequência no gene *OPA1* 52
4.1.3.1. Análise da variação de sequência *rs7624750* 52
4.1.3.2. Análise da variação de sequência *rs34307082* 55
4.1.3.3. Análise da variação de sequência *rs1061648* 58
4.2. Análise genética do gene *OPA3* 60
4.2.1. Sequenciação do gene *OPA3* 60
4.2.2. Análise *in silico* 62
4.2.2.1. Previsão da alteração do *splicing* 62
5. Discussão 63
5.1. Análise do gene *OPA1* 64
5.2. Análise do gene *OPA3* 78
5.3. Perspetivas futuras 81
6. Conclusões 84
7. Referências bibliográficas 86

Índice de figuras

		Página
Figura 1	Genoma mitocondrial humano	4
Figura 2	Fotografia de fundo de um doente com LHON revelando atrofia ótica	12
Figura 3	Mutações primárias da LHON e disfunção do complexo I	15
Figura 4	Diagrama esquemático ilustrando a interação entre os diversos eventos que culminam com a degenerescência do nervo ótico na LHON	19
Figura 5	Representação esquemática do gene *OPA1* e da estrutura da OPA1	20
Figura 6	Esquema representativo das oito isoformas da proteína OPA1	21
Figura 7	Imagem representativa das funções da proteína OPA1: manutenção das cristas, regulação da apoptose, fusão mitocondrial e manutenção do mtDNA	22
Figura 8	Gráfico representativo da distribuição do tipo de mutações patogénicas no gene *OPA1*	24
Figura 9	Representação esquemática do gene *OPA3*	25
Figura 10	Heredograma referente à família 1	31
Figura 11	Esquema representativo das fases da PCR	33
Figura 12	Esquema representativo da purificação dos produtos da PCR pelo reagente *ExoSAP-IT®*	37
Figura 13	Representação esquemática da reação de sequenciação	38
Figura 14	Representação esquemática do processo de sequenciação automática	40
Figura 15	Eletroferogramas referentes à variação de sequência *rs7624750*	48
Figura 16	Heredograma representativo dos genótipos de todos os membros da família 1 analisados para as variações de sequência identificadas no gene *OPA1*	49
Figura 17	Conservação evolutiva do nucleótido (A) e do aminoácido (B) referentes à variação de sequência *rs34307082*	50
Figura 18	Conservação evolutiva do nucleótido (A) e do aminoácido (B) referentes à variação de sequência *rs7624750*	50
Figura 19	Exemplo de um resultado de previsão da patogenicidade de uma variação genética apresentado pelo *Polyphen-2®*	51

Figura 20	Resultado obtido pelo *NNSPLICE v.0.9®* para a previsão da alteração do processo de *splicing* pela variação de sequência *rs3772393*	52
Figura 21	Resultados de PCR-RFLP para a análise da variação de sequência *rs7624750*	53
Figura 22	Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs7624750* em amostras de controlos saudáveis	54
Figura 23	Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs7624750* em amostras de doentes com suspeita clínica de LHON	54
Figura 24	Resultado da técnica de PCR-RFLP para a análise da variação de sequência *rs34307082*	55
Figura 25	Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs34307082* em amostras de controlos saudáveis	56
Figura 26	Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs34307082* em amostras de doentes com suspeita clínica de LHON	57
Figura 27	Resultado da técnica de PCR-RFLP para a análise da variação de sequência *rs1061648*	58
Figura 28	Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs1061648* na amostragem de controlos saudáveis	59
Figura 29	Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs1061648* na amostragem de doentes com suspeita clínica de LHON	59
Figura 30	Eletroferogramas relativos à variação de sequência c.143-23_143-22delCT	62
Figura 31	Resultado obtido pelo *NNSPLICE v.0.9®* para a previsão da alteração do *splicing* pela variação de sequência c.143-23_143-22delCT	62

Índice de tabelas

		Página
Tabela 1	Comparação entre o genoma nuclear e mitocondrial	5
Tabela 2	"Top 10" das mutações primárias da LHON	13
Tabela 3	Mutações patogénicas no gene *OPA3*	27
Tabela 4	Condições da PCR	34
Tabela 5	Caraterização dos *primers* referentes ao gene *OPA1*	35
Tabela 6	Caraterização dos *primers* referentes ao gene *OPA3*	35
Tabela 7	Descrição das variações de sequência identificadas no gene *OPA1* na probanda e familiares	46
Tabela 8	Genótipo dos membros da família 1 relativamente às variações de sequência identificadas no gene *OPA1*	47
Tabela 9	Previsão da patogenicidade da variação de sequência *rs7624750* pelo *Polyphen-2®*	51
Tabela 10	Previsão da patogenicidade da variação de sequência *rs34307082* pelo *Polyphen-2®*	51
Tabela 11	Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs7624750* em controlos saudáveis	53
Tabela 12	Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs7624750* em doentes com suspeita clínica de LHON	54
Tabela 13	Resultados da análise estatística referentes à comparação da distribuição de genótipos e alelos entre doentes com suspeita clínica de LHON e controlos saudáveis relativamente à variação de sequência rs7624750	55
Tabela 14	Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs34307082* em controlos saudáveis.	56
Tabela 15	Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs34307082* em doentes com suspeita clínica de LHON	56
Tabela 16	Resultados da análise estatística referentes à comparação da distribuição de genótipos e alelos entre doentes com suspeita clínica de LHON e controlos saudáveis relativamente à variação de sequência *rs34307082*	57

Tabela 17	Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs1061648* em controlos saudáveis	58
Tabela 18	Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs1061648* em doentes com suspeita clínica de LHON	59
Tabela 19	Resultados da análise estatística referentes à comparação da distribuição de genótipos e alelos entre doentes com suspeita clínica de LHON e controlos saudáveis relativamente à variação de sequência *rs1061648*	60
Tabela 20	Descrição das variações de sequência identificadas no gene *OPA3*	60
Tabela 21	Genótipo dos membros da família 1 relativamente às variações de sequência identificadas no gene *OPA3*	61
Tabela 22	Variações de sequência no gene *OPA1* identificadas nos membros da família 1 que se encontram em desequilíbrio de ligação	74

Lista de Abreviaturas

°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micramolar
A	Adenina
ADOA	Atrofia ótica autossómica dominante (em inglês: *autosomal dominant optic atrophy*)
ADOAC	Atrofia ótica autossómica dominante e cataratas (em inglês: *autosomal dominant optic atrophy and cataract*)
Ala	Alanina
ANT1	Gene codificante do translocador de nucleótidos de adenina (em inglês: *adenine nucleotide translocator 1 gene*)
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina trifosfato (em inglês: *adenosine triphosphate*)
BCS1L	Gene codificante de uma proteína homóloga da bcs1 da *S.cerevisiae* que está envolvida na montagem do complexo III da CRM (em inglês: *BCS1-like protein gene*)
C	Citosina
CGR	Células ganglionares da retina
CRM	Cadeia respiratória mitocondrial
CO	Citocromo c oxidase ou complexo IV da CRM
CYTB	Citocromo b (em inglês: *cytochrome b*)
ddNTPs	2',3'-didesoxinucleótidos
DGE	Domínio GTPase efetor
DGUOK	Gene que codifica a desoxiguanosina cinase (em inglês: *deoxyguanosine kinase gene*)

DNA	Ácido desoxirribonucleico (em inglês: *deoxyribonucleic acid*)
dNTPs	Desoxiribonucleótidos trifosfato
G	Guanina
GTPase	Guanina trifosfatase (em inglês: *guanine triphosphatase*)
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
LC	Locais de clivagem
LINE-1	(em inglês: *long interspersed nucleotide element 1*)
LHON	Neuropatia ótica hereditária de Leber (em inglês: *Leber's hereditary optic neuropathy*)
MAPT	Gene codificante da proteína tau (em inglês: *microtubule-associated protein tau gene*)
MCCC1	Gene codificante da subunidade maior da 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (em inglês: *methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 gene*)
MELAS	Miopatia, encefalopatia, acidose láctica e episódios tipo AVC (em inglês: *mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and Stroke-like episodes*)
MEM	Membrana externa mitocondrial
MFN1	Gene que codifica a Mfn1 (em inglês: *mitofusin 2 gene*)
Mfn1	Mitofusina 1
MFN2	Gene que codifica a Mfn2 (em inglês: *mitofusin 2 gene*)
Mfn2	Mitofusina 2
mg	Miligrama
MGA	Acidúria 3-metilglutacónica tipo III (em inglês: *type III 3-methylglutaconic acidúria*)
MIM	Membrana interna mitocondrial
ml	Mililitro

mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MRPL47	Gene codificante da proteína mitocondrial ribossomal L47 (em inglês: *mitochondrial ribosomal protein L47 gene*)
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
NARP	Neuropatia, ataxia e retinite pigmentar
ND	NADH desidrogenase
nDNA	DNA nuclear
NDUFA1	Gene codificante de um componente essencial do complexo I da CRM (em inglês: *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex gene*)
nm	Nanómetro
O_L	Origem de replicação da cadeia leve
OPA1	Gene que codifica a proteína OPA1 (em inglês: *optic atrophy 1 gene*)
OPA3	Gene que codifica a proteína OPA3 (em inglês: *optic atrophy 3 gene*)
OXPHOS	Fosforilação oxidativa (em inglês: *oxidative phophorylation*)
PARL	Gene codificante da proteína integral da membrana mitocondrial PARL (em ingles: *presenilin associated, rhomboid-like gene*)
PCR	Reação da polimerase em cadeia (em inglês: *polymerase chain reaction*)
PEO	Oftalmoplegia externa progressiva (em inglês: *progressive external oftalmoplegia*)
POLG	Gene codificante da subunidade catalítica da DNA polimerase gama específica do mtDNA (em inglês: *polymerase gamma gene*)
PPM	Peptidase de processamento mitocondrial
RFLP	Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (em inglês: *restriction fragment length polymorphism*)

RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigénio (em ingles: *reactive oxygen species*)
rRNA	RNA ribossomal
RT	Região transmembranar
SCO2	Gene codificante da proteína de *assembly* SCO2 da CO (em ingles: *cytochrome oxidase deficient homolog 2 gene*)
SDHA	Gene codificante da subunidade A da flavoproteína do complexo II da CRM (em inglês: *succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein gene)*
Ser	Serina
SIM	Sequência de importação para a mitocôndria
SLC7A14	Gene codificante de uma proteína pertencente à família 7 de transportadores de solutos (em ingles: *solute carrier family 7 member 14 gene*)
SURF1	Gene codificante do fator de *assembly* da CO, surfeit 1 (em inglês: *surfeit 1 gene*)
T	Timina
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A (em inglês: *transcription factor A, mitochondrial*)
tRNA	RNA de transferência
TWINKLE	Gene codificante da uma helicase mitocondrial, também denominado *PEO1*
U	Uracilo
UTR	Região não traduzida (em inglês: *untranslated region*)
UV	Radiação ultravioleta
Val	Valina
VS	Versus

Glossário de termos clínicos

Anartria	Transtorno da linguagem que consiste na perda de articulação das palavras
Ataxia	Irregularidade de coordenação ao realizar movimentos, com perda de equilíbrio
Catarata	Opacificação do cristalino
Disco ótico	Local onde os axónios das células ganglionares da retina saem do olho para formar o nervo ótico
Discromatopsia	Perturbação da perceção visual caracterizada pela incapacidade de distinção de todas ou algumas cores
Disfunção extrapiramidal	Disfunção de estruturas do sistema extrapiramidal, um conjunto de vias nervosas que se encontra relacionado com a função motora
Distonia	Movimento involuntário dos músculos
Escotoma	Área isolada dentro do campo visual na qual se verifica perda total ou parcial da acuidade visual
Escotoma centrocecal	É caraterístico da LHON e caracteriza-se por surgir devido a uma lesão nas fibras do feixe papilo-macular
Espasticidade	Distúrbio motor caracterizado por rigidez muscular que dificulta ou impossibilita o movimento
Estrabismo	Desvio permanente e espontâneo dos eixos oculares
Feixe papilo-macular	Zona da camada de fibras nervosas da retina que liga a mácula diretamente à papila
Hipotonia	Condição em que existe diminuição ou perda da tonicidade muscular
Microangiopatia talangiectásica peripapilar	Dilatação dos capilares da periferia da papila do nervo ótico
Nistagmo	Movimentos oculares oscilatórios, rítmicos e repetitivos dos olhos
Oftlamoplegia	Paralisia dos músculos oculares
Pancitopenia	Diminuição global de elementos celulares do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas
Ptose	Queda da pálpebra superior com conseguinte estreitamento da abertura palpebral

Reflexo pupilar	Contração da pupila ao expor a retina à luz
Retinite pigmentar	Doença que se caracteriza por cegueira noturna e gradual estreitamento dos campos visuais, e que o fundo do olho tem um aspeto e padrão característico de “sal e pimenta”
Surdez neurossensorial	Tipo de surdez devida a lesão nas células nervosas, provocando danos ao nível do mecanismo de perceção do som desde o ouvido interno até ao cérebro
Talangiectasia	Dilatação dos capilares

Resumo

A neuropatia ótica hereditária de Leber (LHON) é uma doença genética mitocondrial que se caracteriza pela morte de células ganglionares da retina, levando à atrofia do nervo ótico. A LHON afeta predominantemente indivíduos do sexo masculino em idade jovem, sendo a sua principal manifestação clínica a perda súbita de visão central, com evolução rapidamente progressiva. A maioria dos doentes (90 a 95%) possuem uma das três mutações patogénicas primárias do DNA mitocondrial (mtDNA) previamente associadas à doença: m.3460G>A, m.11778G>A e m.14484T>C. Estas variações, localizadas em genes que codificam subunidades do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, afetam a produção de energia. No entanto, as mutações no mtDNA exibem penetrância incompleta, sugerindo que outros fatores genéticos, mitocondriais ou nucleares, poderão estar envolvidos na etiologia da doença. Embora, frequentemente, esta se restrinja a anomalias oftalmológicas, existem casos de LHON-*plus*, com fenótipos mais graves que são agravados por sintomas neurológicos adicionais.

Em 2007, foi publicado um caso de LHON-*plus* verdadeiramente atípico no que respeita à idade de início dos sintomas, género, gravidade e progressão das anomalias neurológicas. A doente em causa apresenta a mutação pontual m.11778G>A, em diversos tecidos, sendo portadores da mesma alteração outros membros da família da linhagem materna, nomeadamente a mãe, avó, tias e tios. No entanto, nenhum destes familiares desenvolveu a doença até ao momento.

A maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo núcleo, sintetizada no citosol e posteriormente importada para a mitocôndria. Assim, existem genes nucleares que podem estar associados a doenças mitocondriais, nomeadamente os genes *OPA1 (optic atrophy 1)* e *OPA3 (optic atrophy 3)*, ambos relacionados com outros tipos de atrofia ótica. Enquanto a função da proteína OPA3 permanece ainda por esclarecer, a proteína OPA1 sabe-se está envolvida na manutenção das cristas mitocondriais, na fusão mitocondrial, na regulação da apoptose e do processo de fosforilação oxidativa e ainda na manutenção do mtDNA. Um estudo publicado em 2010 revelou que a expressão do gene *OPA1* se encontra diminuída em doentes com LHON, sugerindo que este gene poderá constituir um fator com contribuição para a patogénese da doença.

Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em analisar a sequência dos genes *OPA1* e *OPA3,* na probanda e respetivos familiares, com o intuito de encontrar variações genéticas que possam explicar a penetrância incompleta da doença na família bem como o fenótipo atípico de LHON-*plus*.

Os resultados deste estudo, quanto à sequenciação do gene *OPA1,* não permitiram a identificação de um fator genético exclusivo da probanda, relativamente aos restantes familiares portadores da

mutação m.11778G>A. Deste modo, não há evidências de que variações de sequência no gene *OPA1,* em sinergia com a mutação no mtDNA, estejam na causa da manifestação da doença na família em estudo. Contudo, foram identificadas na probanda, entre outras, duas variações de sequência em *OPA1* que conduzem à alteração de aminoácido na sequência da proteína e uma alteração localizada na região 3'UTR do gene. Estas, devido à sua possível relevância ao nível da função da proteína, foram analisadas em controlos saudáveis e em doentes com suspeita clínica de LHON, da população portuguesa e foi encontrada associação para a alteração c.473G>A (p=0,0156).

A análise do gene *OPA3* permitiu a identificação de uma variação de sequência presente na probanda e ausente nos restantes portadores da mutação m.11778G>A. Contudo, trata-se de uma deleção intrónica cuja análise *in silico* efetuada prevê que não tenha como consequência a alteração do processo de *splicing*.

Assim, este estudo não permitiu identificar variantes genéticas que expliquem a penetrância incompleta da mutação m.11778G>A na família em estudo. Porém, não pode ser excluída a hipótese de as variações de sequência identificadas contribuírem para o fenótipo da probanda uma vez que se trata de um caso de LHON-*plus* atípico e grave para o qual poderão contribuir múltiplos fatores genéticos que se manifestem em sinergia com a mutação no mtDNA. Contudo, não pode ser eliminada a possibilidade do envolvimento dos genes OPA1 e OPA3 e respetivas proteínas devido a fatores extrínsecos à sequência genética analisada no presente estudo.

Esta investigação permitiu identificar um possível fator de risco para o desenvolvimento de LHON no sexo masculino, nomeadamente o polimorfismo c.473G>A no gene *OPA1*. O presente estudo é um contributo relevante para o estudo genético da LHON.

Palavras-chave: LHON, *OPA1*, *OPA3*, *Cross-talk* bigenómico.

Abstract

Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is a mitochondrial genetic disease characterized by retinal ganglion cells death, leading to optic nerve atrophy. LHON predominantly affects young males and its main clinical manifestation is the lost of central vision with rapid and progressive evolution. Most of the patients (90 to 95%) have one of the three mitochondrial DNA (mtDNA) mutations previously associated with the disease: m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C. These variations, located in genes that codifying complex I subunits of the mitochondrial respiratory chain, affect energy production. However, mtDNA mutations have incomplete penetrance, suggesting that other genetic factors, mitochondrial or nuclear, may be involved in the disease's aetiology. Although visual failure is the main clinical feature of the disease, other neurological abnormalities leading to the development of more severe phenotypes called LHON-*plus* have also been reported.

In 2007 it was reported a LHON-*plus* case, atypical for age of onset, gender, severity and progression of the associated neurological findings. The female patient has the m.11778G>A mutation, in various tissues, and other maternal relatives are carriers for the same genetic alteration, namely her mother, grandmother, aunts and uncles. However, none of the relatives have the disease so far.

The majority of mitochondrial proteins is nuclear-encoded, synthesized in the cytosol and then imported to the mitochondria. Thus, there are nuclear genes that could be associated to mitochondrial diseases, such as *OPA1* (optic atrophy 1) and *OPA3* (optic atrophy 3), both related to other optic atrophies. While OPA3 function remains poorly understood, the role of OPA1 is well known in mitochondrial cristae maintenance, mitochondrial fusion, apoptosis and oxidative phosphorylation regulation and mtDNA maintenance. A paper published in 2010 demonstrated that *OPA1* expression is reduced in LHON patients, suggesting that this gene could contribute to disease pathogenesis.

Thus, the aim of this work was to analyze the sequence of *OPA1* and *OPA3* genes, in the proband and relatives, in order to find genetic variations that could explain both the incomplete penetrance of the disease in the family and the atypical LHON-*plus* phenotype.

The results of *OPA1* gene sequencing did not allow the identification of a genetic factor present only in the proband and absent in the relatives carrying the same mtDNA mutation. Accordingly, there is no evidence that sequence variations in *OPA1* gene, acting synergistically with the mtDNA mutation, are the cause of disease in the family. Nevertheless we identified, among others, two sequence variations which lead to amino-acid alteration in protein sequence and one other alteration located

in the 3'UTR region of the *OPA1* gene. These were analyzed in healthy controls and LHON patients from the Portuguese population and a positive association was found for c.473G>A (*p*=0,0156).

OPA3 gene analysis allowed the identification of a sequence variation in the proband that is absent in the relatives with the m.11778G>A mutation. However, this is an intronic deletion and in silico analysis indicates that it does not change splicing process.

In this study, we have not identified genetic variations that could explain the incomplete penetrance related to the m.11778G>A mutation in the family under study. However, we cannot exclude the possibility that these variations contribute to the proband's phenotype because it is an atypical and severe LHON-*plus* case, which may have the contribution of multiple genetic variations acting in synergy with the mtDNA mutation. However, we cannot exclude the possibility of *OPA1* and *OPA3* genes and corresponding proteins involvement due to factors extrinsic to the gene sequence analyzed in this study.

This investigation allowed the identification of a possible risk factor for the development of LHON in males, the polymorphism c.473G>A. The present study is a relevant contribution for the genetic study in LHON.

Keywords: LHON, *OPA1*, *OPA3,* bigenomic cross-talk.

1. Introdução

1.1. Doenças mitocondriais

O conceito de doença mitocondrial foi introduzido pela primeira vez em 1962 quando Luft e colaboradores descreveram uma mulher com hipermetabolismo de origem não tiroidal, apresentando anomalias ao nível da manutenção do controlo da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) (Luft *et al*., 1962).

O processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS) constitui uma via metabólica ubiquitária que fornece energia à maioria dos órgãos e tecidos. Consequentemente, deficiências ao nível deste sistema bioquímico podem, teoricamente, dar origem a qualquer sintoma, em qualquer órgão ou tecido, em qualquer idade e com qualquer modo de hereditariedade, devido à dupla origem genética das enzimas da CRM (Rötig & Munnich, 2003). No entanto, é frequentemente verificado que as doenças mitocondriais envolvem preferencialmente o músculo e o cérebro, ambos tecidos pós-mitóticos e com taxas metabólicas e gastos energéticos elevados. Assim, as principais manifestações clínicas das doenças mitocondriais incluem sintomas neuromusculares, tais como: convulsões, enxaqueca, debilidade do músculo-esquelético, distonia, intolerância ao exercício, acidente vascular cerebral, cardiomiopatia, surdez neurossensorial, atrofia ótica, retinite pigmentar, ptose, oftalmoplegia, diabetes *mellitus*, hipotiroidismo, refluxo gastrointestinal, disfunção renal ou imunodeficiência, entre outros (McFarland & Turnbull, 2009; Wong, 2010).

Estudos realizados no nordeste de Inglaterra estimaram que 9,2 em 100.000 adultos manifestam doença mitocondrial associada a alterações genéticas no DNA mitocondrial (mtDNA) e que 16,5 em 100.000 indivíduos da população em geral possui risco elevado de desenvolvimento de doença mitocondrial em virtude da relação em primeiro grau com indivíduos afetados (Schaefer *et al*., 2008). A prevalência das doenças mitocondriais na população infantil é mais difícil de determinar, em parte devido ao facto da dificuldade em alcançar o diagnóstico genético, uma vez que, na maioria dos casos, estão envolvidas mutações não identificadas no DNA nuclear (nDNA) (Uusiama *et al*., 2000). No entanto, é possível que as mutações no mtDNA ocorram mais frequentemente na população pediátrica do que atualmente é conhecido, mas a sua prevalência permaneça baixa devido ao facto de serem fatais na infância ou da sua heteroplasmia estar abaixo do limiar detetável no momento da investigação (McFarland & Turnbull, 2009). De acordo com os resultados combinados de estudos epidemiológicos de doenças mitocondriais, em crianças e adultos, a prevalência mínima estimada para estas patologias é de cerca de 1 em 5.000 (Schaefer *et al*., 2004).

A era molecular das doenças mitocondriais teve início em 1988 com a descrição das primeiras mutações patogénicas no mtDNA, nomeadamente grandes deleções em doentes com miopatia mitocondrial e a mutação pontual m.11778G>A, presente em famílias com neuropatia ótica

hereditária de Leber (LHON) (Holt *et al*., 1988; Wallace *et al*., 1988). A identificação de genes nucleares responsáveis por doenças mitocondriais ocorreu posteriormente, em 1995, quando Bourgeron e colaboradores identificaram uma mutação homozigótica no gene que codifica a succinato desidrogenase A (*SDHA*), uma subunidade do complexo II da CRM (Bourgeron *et al*., 1995).

Atualmente, sabe-se que as doenças mitocondriais podem ser causadas por defeitos genéticos em qualquer gene do mtDNA ou nDNA que codifique fatores mitocondriais (proteínas ou RNAs) com relevância na atividade da CRM e, consequentemente, com impacto na produção de energia pelo processo de OXPHOS (Wallace *et al*., 2010). Dependendo da causa primária, as doenças mitocondriais podem ser autossómicas recessivas, autossómicas dominantes, ligadas ao X ou com hereditariedade materna (Wong, 2010).

Várias doenças mitocondriais têm sido descritas como estando frequentemente, mas não sempre, associadas a um genótipo particular. No entanto, esta associação de fenótipo com genótipo está longe de ser concreta nestas doenças, uma vez que diferentes mutações no mtDNA ou no nDNA podem resultar no mesmo fenótipo, tal como uma mutação no mtDNA pode originar diferentes fenótipos (McFarland & Turnbull., 2009). Por exemplo, a mutação mais comum no mtDNA, m.3243A>G, pode causar miopatia, encefalopatia, acidose láctica e episódios tipo AVC (MELAS), diabetes, surdez ou retinopatia. Contribuem ainda para a heterogeneidade das doenças mitocondriais a distribuição da mutação nos tecidos, no caso do mtDNA, uma vez que algumas mutações estão apenas presentes nos tecidos afetados e a "penetrância" variável, descrita para várias mutações (Tuppen *et al*., 2010; Wong, 2010).

1.1.1. O genoma mitocondrial e as doenças mitocondriais

Apesar da grande maioria das proteínas mitocondriais serem codificadas pelo genoma nuclear e posteriormente importadas para a mitocôndria, este organelo possui o seu próprio genoma que é essencial para o processo de OXPHOS (Chan, 2006). O genoma mitocondrial foi sequenciado na sua totalidade pela primeira vez em 1981 (Anderson *et al*., 1981), tendo sido alvo de uma revisão em 1999 (Andrews *et al*., 1999).

O genoma mitocondrial é uma molécula circular, de cadeia dupla, constituída por 16.568 pares de bases (pb) no caso da espécie humana (figura 1). Nos mamíferos, as duas cadeias de mtDNA diferem na sua distribuição de guaninas (G) e citosinas (C), resultando numa cadeia "leve" rica em C e numa cadeia "pesada" rica em G (Wallace & Fan, 2009).

O mtDNA contém trinta e sete genes, dos quais treze codificam subunidades do sistema de OXPHOS. O genoma mitocondrial codifica também vinte e dois RNAs de transferência (tRNAs) e dois RNAs

ribossomais (rRNAs) mitocondriais, fatores essenciais para a síntese dos treze polipeptídeos (Chan, 2006; McFarland & Turnbull, 2009). Todos os genes que codificam para polipeptídeos e rRNAs estão localizados na cadeia pesada, exceto o gene *ND6* que se localiza na cadeia leve. O mtDNA codifica ainda para uma região controlo (D-loop) que engloba os promotores para ambas as cadeias, bem como a origem de replicação da cadeia pesada (Wallace & Fan, 2009). Esta região, com 1,1 Kb, constitui uma das poucas não codificantes do mtDNA, uma vez que este não possui intrões, apresentando contudo alguns nucleótidos não codificantes ao longo da sequência (Grazina, 2004; Tuppen *et al*., 2010).

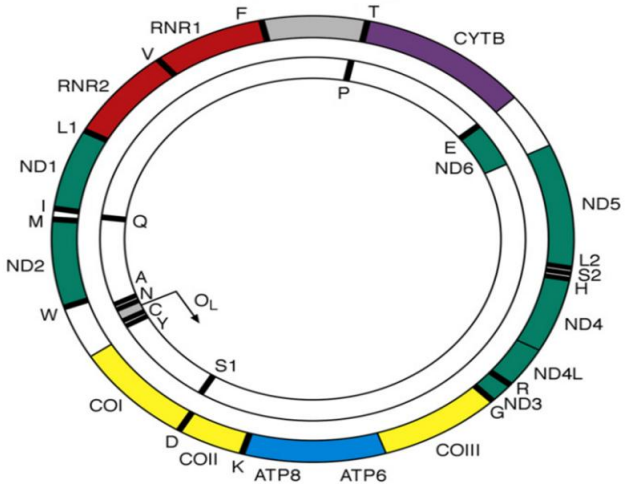

Figura 1. Genoma mitocondrial humano.
O círculo externo representa a cadeia pesada e o círculo interno a cadeia leve do mtDNA. O mtDNA humano codifica dois mt-rRNAs (vermelho), RNR1 (12S rRNA) e RNR2 (16 rRNA), vinte e dois mt-tRNAs (barras pretas) e treze polipeptídeos da CRM, nomeadamente: ND1-ND6 e ND4L, subunidades do complexo I (verde); CYTB, uma subunidade do complexo III (roxo); COI-COIII, subunidades catalíticas do complexo IV (amarelo) e a ATP6 e ATP8, subunidades do complexo V (azul). As principais regiões não codificantes (cinzento) incluem o D-loop e a origem de replicação da cadeia leve (O_L) (adaptado de Tuppen *et al*., 2010).

A mitocôndria possui sistemas de replicação, transcrição e tradução independentes (Rötig & Munnich, 2003). Assim, o mtDNA tem a capacidade de replicação independentemente do ciclo celular e da replicação do genoma nuclear (Reeve *et al*., 2008). A replicação do mtDNA requer a participação de fatores codificados por genes nucleares, tais como a DNA polimerase gama (POLG) e a DNA helicase TWINKLE. Estas, em conjunto com o fator de transcrição A (TFAM), associam-se ao mtDNA, formando estruturas denominadas nucleóides que se acredita serem as unidades de

transmissão do mtDNA. Estes complexos DNA-proteína possuem 6 a 10 cópias de mtDNA e estão associados à membrana interna mitocondrial (MIM), podendo ser trocados entre mitocôndrias. Outras proteínas para além das referidas anteriormente fazem também parte destes complexos, nomeadamente proteínas envolvidas na reparação e manutenção do mtDNA. De modo a assegurar o pool de dNTP's na mitocôndria são necessárias as proteínas codificadas pelos genes nucleares DGUOK e TK2 (Taylor & Turnbull, 2005; Tuppen et al., 2010; Wong, 2010).

Na espécie humana, o mtDNA é herdado via materna uma vez que as mitocôndrias presentes no espermatozoide são marcadas com ubiquitina para degradação. Consequentemente, todo o conteúdo mitocondrial do zigoto é de origem materna (Chan, 2006). A transmissão paterna do mtDNA é um evento extremamente raro em humanos, existindo apenas um único caso publicado na literatura (Schwartz & Vissing, 2002). A hereditariedade materna é apenas uma das várias diferenças existentes entre o mtDNA e o nDNA, sendo outras referenciadas na tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre o genoma nuclear e mitocondrial (adaptado de Taylor & Turnbull, 2005).

Característica	Genoma nuclear	Genoma mitocondrial
Tamanho	≈ $3,3 \times 10^9$ pb	16568 pb
Estrutura	Dupla hélice; cromossomas	Cadeia dupla circular
Número de moléculas de DNA por célula	23 nas células haplóides; 46 nas células diplóides	Várias cópias por célula
Número de genes	≈ 20000 a 30000	37
Intrões	Presentes na maioria dos genes	Ausentes
% de DNA codificante	≈ 3%	≈ 93%
Código genético	Universal	AUA codifica a metionina; TGA codifica o triptofano; AGA e AGG são codões stop
Proteínas associadas	Nucleossoma (associação de proteínas, incluindo histonas)	Histonas ausentes; associação a algumas proteínas para formar os nucleóides
Hereditariedade	Mendeliana para os autossomas e cromossoma X. Paterna para o cromossoma Y.	Materna

Os genes mitocondriais possuem uma taxa de mutação muito superior àquela que é verificada para os genes nucleares. Esta deve-se em parte à proximidade do mtDNA relativamente à MIM, onde as espécies reativas de oxigénio (ROS) estão continuamente a ser produzidas como produto secundário da OXPHOS. O facto de este não possuir histonas protetoras e de estarem ausentes sistemas de reparação e de revisão eficientes contribui também para a elevada taxa mutacional do mtDNA (Reeve et al., 2008; Wallace & Fan, 2009; Wong, 2010).

A elevada taxa de mutação do mtDNA é responsável, não só pelo surgimento de mutações patogénicas, mas também pela acumulação de variações de sequência comuns, que são encontradas

em várias populações humanas. Uma vez que o mtDNA não sofre recombinação, este pode apenas ser alterado em resultado de uma acumulação sequencial de variações de sequência ao longo de linhagens maternas (Wallace & Fan, 2009). Ao longo do processo evolutivo, os seres humanos acumularam variações distintas no seu mtDNA relativamente ao ancestral, resultando em diferentes haplótipos característicos de diferentes grupos étnicos, denominados haplogrupos (Wallace *et al*., 1999).

Cada célula contém centenas ou milhares de cópias de mtDNA, as quais, no processo de divisão celular, são distribuídas aleatoriamente pelas células filhas. Em tecidos normais, todas as moléculas de mtDNA são idênticas, condição que se designa homoplasmia (DiMauro & Schon, 2008). A heteroplasmia refere-se à existência de uma mistura de dois ou mais genótipos mitocondriais (Taylor & Turnbull, 2005). O nível de heteroplasmia pode variar consideravelmente de tecido para tecido ou mesmo de célula para célula (Lightowlers *et al*., 1997).

Uma vez que, durante a mitose, as mitocôndrias são segregadas aleatoriamente, verifica-se que nas células heteroplásmicas a proporção de mtDNA mutante pode ser alterada (Tuppen *et al*., 2010). Assim, um aspeto intrigante da genética mitocondrial consiste no fenómeno de expansão clonal. Este está relacionado com o facto de uma mutação no mtDNA, numa célula, aumentar para níveis capazes de causar disfunção mitocondrial e, em última instância, morte celular (Reeve *et al*., 2008).

As mutações referentes a substituições de bases podem estar localizadas em genes que codificam proteínas, rRNAs ou tRNAs e são geralmente heteroplásmicas, com algumas exceções. Estão identificadas mais de 200 mutações patogénicas de substituições de bases no mtDNA, associadas a um largo espectro de fenótipos clínicos. Mais de metade das doenças relacionadas com mutações pontuais no mtDNA estão localizadas em genes que codificam tRNAs. Funcionalmente, as mutações pontuais em genes mitocondriais que codificam subunidades dos complexos da CRM, afetam a função do respetivo complexo a que pertence a proteína. Por sua vez, a redução da disponibilidade de tRNAs funcionais, em consequência de mutações nos genes que os codificam, pode comprometer todo o processo de tradução (Wallace & Fan, 2009; Tuppen *et al*., 2010). As mutações em genes que afetam os complexos da CRM estão localizadas predominantemente em genes que codificam subunidades dos complexos I e II, sugerindo que mutações nos restantes complexos são mais raras ou incompatíveis com a vida (DiMAuro & Schon, 2008).

As doenças mitocondrias causadas por mutações no mtDNA estão frequentemente associadas a situações de heteroplasmia, como foi anteriormente referido. Assim, a expressão clínica das mutações patogénicas no mtDNA é essencialmente determinada pela proporção relativa de moléculas normais e mutantes, nos diferentes tecidos. É necessária uma percentagem mínima de

mtDNA mutado, frequentemente cerca de 80-90%, para causar défice da OXPHOS num órgão ou tecido e, consequentemente, doença. Esta particularidade das mutações no genoma mitocondrial toma a designação de efeito limiar (DiMauro & Schon, 2008). Verifica-se que com o aumento da percentagem de moléculas de mtDNA mutadas ocorre diminuição da função energética mitocondrial. Quando é atingido o efeito limiar, ocorre apoptose celular e sucedem-se as manifestações fenotípicas (Wallace & Fan, 2009). Por exemplo, dependendo do grau de heteroplasmia, a mutação m.8993T>G pode ser assintomática (<60%), causar retinopatia (60-75%), neuropatia, ataxia e retinite pigmentar (NARP) (75-90%) ou síndrome de Leigh (>90%) (Enns *et al*., 2006). A LHON é uma exceção a este princípio, sendo causada frequentemente por mutações homoplásmicas que se encontram presentes tanto em indivíduos sintomáticos como em familiares da linhagem materna assintomáticos (Wallace *et al*., 1988). Assim, verifica-se que a manifestação fenotípica das mutações homoplásmicas pode diferir entre famílias ou mesmo entre indivíduos da mesma família (DiMauro & Schon, 2008).

As mutações no mtDNA, embora sejam responsáveis por um elevado número de doenças, exibem frequentemente "penetrância" variável, implicando o envolvimento de outros fatores. Estes incluem o haplótipo do mtDNA, genes nucleares e fatores ambientais. Diferentes haplótipos podem modular o processo de OXPHOS, influenciando a fisiologia do indivíduo e predispondo-o ou protegendo-o de certas doenças. Os fatores nucleares envolvidos podem ser polimorfismos comuns, possivelmente localizados em genes relacionados com a função mitocondrial e que não induzem patologia por si só, mas contribuem para o efeito patogénico da mutação do mtDNA (Carelli *et al*., 2003; DiMauro & Schon, 2008).

1.1.2. Doenças mitocondriais de origem nuclear

Estima-se que cerca de 1.500 proteínas codificadas pelo nDNA são direcionadas para a mitocôndria. Assim, defeitos em qualquer um dos genes que as codificam podem potencialmente causar doença mitocondrial. Contudo, até à data estão identificadas mutações patogénicas em apenas 150 genes nucleares. Defeitos moleculares em genes nucleares contribuem para a maioria das doenças mitocondriais graves presentes em crianças (Wong, 2010).

Os genes nucleares associados a doenças mitocondriais codificam uma variedade de proteínas relevantes para o funcionamento normal da mitocôndria, nomeadamente: elementos estruturais (exemplos: *NDUFA1*), proteínas de *assembly* dos complexos (exemplos: *SURF1*, *SCO2*, *BCS1L*), maquinaria de importação (*DDP*), fatores envolvidos na síntese e reparação do mtDNA (*POLG*, *TWINKLE*), proteínas relacionadas com a manutenção do *pool* de nucleótidos intra-mitocondrial (*ANT1*, *DGOUK*, *TK2*) e fatores que asseguram a integridade mitocondrial (exemplos: *OPA1*, *MFN2*). Destes genes, o *POLG* é aquele que possui o maior número de mutações descritas, sendo responsável

pela grande maioria das doenças mitocondriais com causa genética de origem nuclear (McFarland & Turnbull, 2009).

Mutações no nDNA pouco lesivas por si só, podem interagir com mutações no mtDNA que, isoladamente, são também toleráveis, resultando em doença grave. Potluri e colaboradores (2009) verificaram que dois doentes com doença mitocondrial grave possuíam uma mutação num gene nuclear, *NDUFA1*, que, por si, só reduzia a atividade do complexo I em apenas 30%. Contudo, os doentes apresentavam ausência total de atividade deste complexo no músculo-esquelético. Em análise posterior, foi revelado que ambos possuíam duas mutações no mtDNA que, isoladamente, também diminuíam a atividade do complexo I em cerca de 30%. Assim, a combinação das mutações no nDNA e mtDNA geraram um defeito bioquímico grave.

1.1.3. Doenças devidas a defeitos na comunicação bigenómica

Mutações em genes nucleares que afetam a biogénese da mitocôndria podem resultar em danos ao nível do mtDNA, tal como mutações no mtDNA podem modificar a expressão de variantes genéticas nucleares. Esta interação nDNA-mtDNA resulta em padrões de hereditariedade não clássicos associados a doenças metabólicas e neurodegenerativas (Wallace & Fan, 2009).

As mutações patogénicas do mtDNA incluem substituições de bases e rearranjos. As síndromes de rearranjo são invariavelmente heteroplásmicas e podem resultar numa variedade de manifestações clínicas com gravidade variável (Wallace & Fan, 2010). A doença mais grave relacionada com rearranjos do mtDNA é a síndrome de Pearson, que se caracteriza pelo desenvolvimento de pancitopenia numa idade precoce (Rötig *et al*., 1988). Os fenótipos menos graves relacionados com este tipo de mutações no mtDNA são a diabetes e surdez (Ballinger *et al*., 1992). A maioria dos rearranjos no mtDNA são grandes deleções que variam entre 1,3 a 8 Kb e abrangem vários genes (Tuppen *et al*., 2010). A ocorrência de múltiplas deleções no mtDNA pode ser devida a mutações em genes nucleares cujos produtos estão envolvidos na manutenção e replicação do mtDNA (exemplo: *POLG* e *TWINKLE*), bem como no metabolismo dos nucleótidos mitocondriais (exemplo: *ANT1*) (Kaukonen *et al*., 2000; Spelbrink *et al*., 2001; Hudson *et al*., 2006).

Para além das alterações qualitativas no mtDNA anteriormente especificadas, existem publicados na literatura casos de depleção, isto é, alterações quantitativas no conteúdo de mtDNA, nomeadamente uma redução do número de cópias, causada por mutações em genes nucleares responsáveis pela biossíntese das moléculas de mtDNA, tais como o *TWINKLE*, *TK2*, *POLG* e *DGUOK* (Spinazzola *et al*., 2009; Wong, 2010).

1.2. Atrofias óticas

O nervo ótico transmite informação visual da retina neurossensorial para o córtex visual. Em humanos, cada nervo ótico com cerca de 1,2 milhões de axónios que emergem das células ganglionares da retina (CGR), recebe informação visual dos fotorreceptores retinianos. Após saírem do olho, estes axónios tornam-se mielinizados e transmitem a informação visual para o tálamo. A perda das CGR ou dos seus axónios conduz à neuropatia ótica, cuja manifestação mais severa é a atrofia ótica (Amati-Bonneau *et al*., 2009).

As neuropatias óticas hereditárias afetam pelo menos 1 em cada 10.000 indivíduos, representando deste modo uma causa importante de deficiência visual crónica (Man *et al*., 2011a). Este grupo heterogéneo de doenças genéticas é caracterizado genericamente pela morte de CGR, conduzindo à perda de visão central, discromatopsia e outras anomalias no campo de visão, sendo o feixe papilo-macular preferencialmente afetado (Votruba, 2004).

A identificação dos fatores genéticos envolvidos neste grupo de doenças permitiu a existência de uma classificação precisa tendo como base dados moleculares (Man *et al*., 2011a). A LHON e a atrofia ótica autossómica dominante (ADOA) constituem as duas formas mais comuns de neuropatias óticas, sendo um exemplo de como as doenças mitocondriais podem ser devidas a defeitos genéticos, quer no mtDNA ou no nDNA. Assim, enquanto para a ADOA se conhecem mutações num gene nuclear, *OPA1* (*optic atrophy 1*), a LHON é devida a mutações pontuais no mtDNA e constitui a doença primária mais comum associada ao mtDNA (Man *et al*., 2003; Amati-Bonneau *et al*., 2008; Man et al., 2009a). Esta caracteriza-se por uma perda de visão frequentemente aguda ou subaguda. Nas restantes neuropatias óticas, a perda de visão é geralmente gradual (Votruba, 2004; Ferré *et al*., 2009).

A ADOA, também denominada doença de Kjer, é a forma de neuropatia ótica hereditária mais comum (Ferré *et al*., 2009). A doença é normalmente diagnosticada em idade precoce, durante a infância, verificando-se um início da perda de capacidade visual, em média, entre os 6 e os 10 anos de idade (Man *et al*., 2011a). O prognóstico geral desta atrofia ótica é mais favorável quando comparado com o da LHON, verificando-se, no entanto, grande variabilidade inter e intrafamiliar na gravidade dos sintomas (Man *et al*., 2009a). Em alguns casos, as manifestações clínicas da LHON e ADOA são agravadas por sintomas neurológicos adicionais, tendo nestes casos a designação de fenótipos *plus*, nomeadamente LHON-*plus* e ADOA-*plus* (Chevrollier *et al*., 2008).

Para além da ADOA e da LHON, fazem ainda parte deste grupo de doenças as atrofias óticas recessivas (Votruba, 2004). Ao contrário do que se verifica nas atrofias óticas anteriormente referidas, nas quais o nervo ótico é geralmente o único implicado, as atrofias óticas recessivas são

doenças multissistémicas caracterizadas pela presença de anomalias extraoculares, nomeadamente ao nível do sistema nervoso central, fazendo parte deste grupo mais de quinze doenças (Assink *et al*., 1997; Ferré *et al*., 2009). A acidúria 3-metilglutacónica tipo III (MGA) ou síndrome de Costeff, apresenta-se como uma doença neuro-oftalmológica recessiva e caracteriza-se clinicamente pelo desenvolvimento de atrofia ótica bilateral, espasticidade, ataxia, disfunção extrapiramidal e défice cognitivo. A excreção urinária de ácido 3-metil-glutacónico e de ácido 3-metil-glutárico está aumentada nestes doentes, sendo por isso considerada um marcador da doença que auxilia o diagnóstico precoce em crianças com atrofia ótica. O fator genético causador desta doença está associado ao gene nuclear *OPA3* (*optic atrophy 3*) (Anikster *et al*., 2001). Estudos mais recentes revelam que mutações neste gene estão também presentes na forma autossómica dominante e cataratas (ADOAC) que se caracteriza-se por atrofia ótica, cataratas e também anomalias neurológicas, tais como sinais extrapiramidais (Reynier *et al*., 2004; Huizing *et al*., 2010).

As três formas de atrofias óticas hereditárias para as quais as bases moleculares são conhecidas envolvem tanto o mtDNA, no caso da LHON, como os genes nucleares *OPA1* e *OPA3*, codificantes de proteínas mitocondriais. Deste modo, é evidenciado que a alteração da função mitocondrial possui um papel essencial na patogénese das neuropatias óticas. Apesar de ainda não se conhecerem totalmente os mecanismos patogénicos subjacentes a estas doenças, sabe-se que ADOA, ADOAC e LHON partilham defeitos a nível da OXPHOS, sendo estes mais acentuados em fenótipos-*plus* (Chevrollier *et al*., 2008). Para além disso, as três doenças estão associadas a atrofia ótica com ausência de inflamação, sendo este um dado consistente com a hipótese de um mecanismo apoptótico ser a causa da morte das CGR (Reynier *et al*., 2004).

1.2.1. Neuropatia ótica hereditária de Leber

1.2.1.1. Caracterização clínica

A primeira descrição de um doente com LHON, publicada por von Graefe, data de há mais de 150 anos. No entanto, a doença foi apenas reconhecida como entidade clínica distinta em 1871 pelo oftalmologista Theodor Leber (Graefe, 1858; Leber, 1871; Kirches, 2011). A LHON é uma doença genética mitocondrial, neurodegenerativa e com hereditariedade materna, sendo transmitida apenas pelo sexo feminino. A sua principal característica é a perda súbita de visão central (Koilkonda & Guy, 2011). A LHON afeta predominantemente indivíduos do sexo masculino em idades jovens, representando estes casos cerca de 80% dos totais. O início da perda visual na doença ocorre frequentemente entre os 15 e os 35 anos de idade (Yen *et al*., 2006).

Atualmente existem poucos estudos epidemiológicos referentes à LHON, sendo um dos de maior dimensão realizado no Nordeste da Inglaterra, tendo como base manifestações clínicas e genéticas da doença. Os resultados demonstraram que a prevalência da LHON é de 1 em 31.000 indivíduos e que aproximadamente 1 em 8.500 é portador de uma das três mutações primárias no mtDNA associadas à doença (Man *et al*., 2003). Em 2007 foi realizado um outro estudo epidemiológico, na Finlândia, através do qual a prevalência da LHON neste país foi estimada em 1:50.000. Os dados deste estudo demonstraram também que 1 em 9.000 indivíduos da população em geral é portador de uma das três mutações primárias associadas à LHON (Puomila *et al*., 2007). Mais recentemente, em 2011, foi publicado um estudo relativo a uma meta-análise que pretendeu estimar a prevalência da LHON na Europa, concluindo que esta é de 1:45.000 (Mascialino *et al*., 2011). Em Portugal, considerando um estudo realizado entre 1997 e 2003, com 21 doentes com suspeita clínica de LHON, a prevalência estimada foi de 1:384.615 (Grazina, 2004).

Clinicamente, como já foi referido, a LHON é caracterizada pela perda aguda ou subaguda de visão central, em consequência da degenerescência das CGR no feixe papilo-macular (Kirkman *et al*., 2009). Contudo, embora frequentemente a perda visual seja rápida e extrema, pode ser um processo mais lento em alguns casos, ocorrendo durante um período de dois anos. Na maioria dos doentes, a disfunção visual é bilateral com envolvimento simultâneo do segundo olho, em 25% dos indivíduos, ou posterior, em 75% dos casos de LHON (Yen *et al*., 2006; Man et al., 2009a; Koilkonda & Guy, 2011).

A LHON pode ser classificada em quatro fases de acordo com as manifestações clínicas: pré-sintomática, aguda, crónica e de recuperação visual. A fase pré-sintomática é caracterizada pela disfunção subtil do nervo ótico. O primeiro sintoma da doença, e que pode ser observado nesta fase, é a microangiopatia telangiectásica peripapilar. Existem também evidências de que portadores assintomáticos da doença possuem níveis flutuantes de edema das fibras nervosas retinianas. Em alguns casos, verifica-se também perda de visão a cores, afetando principalmente o sistema vermelho-verde, reduzida sensibilidade aos contrastes e parâmetros eletrofisiológicos anormais (Huoponen *et al*., 2001; Man *et al*., 2011a).

Os portadores da doença permanecem assintomáticos até sentirem visão turva e desfocada num dos olhos, o que caracteriza o início da fase aguda, na qual ocorre a perda de visão. Os exames oftalmoscópicos revelam telangiectasia peripapilar, microangiopatia, dilatação da cabeça do nervo ótico e tortuosidade vascular. Verifica-se também o desenvolvimento de escotoma centrocecal. O reflexo pupilar é preservado e os doentes geralmente não possuem dor ao realizar os movimentos do olho. A acuidade visual atinge o seu ponto mais baixo quatro a seis semanas após o surgimento da

doença, verificando-se valores de Snellen de 20/200 ou inferiores (Huoponen, 2001; Man *et al*., 2009a; Koilkonda & Guy, 2011).

Na fase crónica da doença, ocorre progressão para atrofia ótica (figura 2). A palidez do nervo ótico torna-se evidente devido à escavação patológica do disco ótico com perda mais acentuada de axónios das CGR. Se um doente for apenas observado nesta fase é difícil conseguir um diagnóstico preciso, especialmente se houver ausência de história familiar, devido à dificuldade de exclusão de outras causas possíveis da neuropatia ótica bilateral (Man *et al*., 2011a)**.** Nesta fase da doença, há progressão para escotoma central absoluto. A grande maioria dos doentes fica completamente cego no prazo de um ano após o início da doença (Huoponen *et al*., 2001; Mascialino *et al*., 2011).

Figura 2 – Fotografia de fundo de um doente com LHON revelando atrofia ótica (retirado de Grazina *et al*., 2007, com permissão).

A recuperação visual, embora seja rara, pode verificar-se até mesmo alguns anos após o início dos sintomas e é influenciada pelo *status* mutacional. A recuperação dos parâmetros visuais não é apenas restrita à acuidade, podendo também incluir o desenvolvimento de pequenas ilhas com campo de visão normal (fenestrações) no escotoma central, ou reversão da discromatopsia (Man *et al*., 2009a). A recuperação visual é mais propensa a acontecer nos casos em que a doença se iniciou antes dos vinte anos de idade e teve uma progressão mais lenta (Barboni *et al*., 2006).

Frequentemente, a LHON restringe-se à presença de alterações oftalmológicas. No entanto, existem os casos de LHON-*plus* nos quais se verificam anomalias neurológicas adicionais, tais como convulsões, atraso mental, neuropatia periférica, tremor postural, parkinsonismo, ataxia cerebelar, anartria, distonia e encefalopatia ligeira. Já foram também descritas alterações na ressonância magnética cerebral, nomeadamente lesões na substância branca semelhantes às que são observadas na esclerose múltipla (Grazina *et al*., 2007; Koilkonda & Guy, 2011). A probabilidade de desmielinização em portadores de LHON é de 1 em 20, sendo este valor 50 vezes superior à prevalência de esclerose múltipla na população em geral (Vanopdenbosch *et al*., 2000; Palace, 2009). Um estudo realizado por Nikoskelainen e colaboradores (1995) demonstrou que 59% dos doentes com LHON, portadores de uma das três mutações primárias, possuem anomalias neurológicas. Já foi também identificada a sobreposição de LHON com a doença mitocondrial MELAS (Blakely *et al*., 2005).

Atualmente, não existe uma terapia eficaz para a LHON nem para outra doença causada por mutações no mtDNA (Guy *et al*., 2008). No entanto, algumas destas doenças respondem a

tratamento com agentes estimuladores da produção energética. Em 2000, foi publicado um estudo que demonstrou que a idebenona, em combinação com a vitamina B2 e a vitamina C, possui a capacidade de melhorar a recuperação visual em doentes com LHON em fase inicial, devido à estimulação da formação de ATP (Mashima *et al*., 2000). Contudo, um estudo publicado posteriormente por Barnils e colaboradores veio contradizer estes resultados (Barnils *et al*., 2007). Mais recentemente, foi avaliado o efeito da idebenona em fibroblastos de doentes com LHON, sendo possível concluir que este análogo da Coenzima Q possui a capacidade de aumentar em 42% a atividade do complexo I da CRM. No entanto, os fibroblastos dos vários doentes do estudo não responderam ao tratamento da mesma forma, indicando que nem todos os afetados com a doença estarão predispostos a beneficiar desta terapia (Angebault *et al*., 2011). Deve ter-se em conta as limitações do estudo relativamente à transposição dos resultados obtidos em células em cultura para o organismo humano.

1.2.1.2. Causas genéticas

Em 1988, a LHON foi a primeira doença humana associada a uma mutação pontual no mtDNA (Wallace *et al*., 1988). Atualmente, sabe-se que 90 a 95% dos doentes com LHON possui uma das três mutações primárias no mtDNA associadas à doença: m.3460G>A, m.11778G>A e m.14484T>C (Man et al., 2011a). Estas fazem parte do "top 10" das mutações da LHON que representa as dez mutações descritas mais comuns associadas à doença (tabela 2).

Tabela 2. "Top 10" das mutações primárias da LHON (adaptado de www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON).

Mutação	Gene	Substituição de aminoácido	Referência
m.3460G>A	*ND1*	R340H	Howell *et al*., 1991; Huoponen *et al*., 1991
m.11778G>A	*ND4*	A52T	Wallace *et al*., 1988
m.14484T>C	*ND6*	M64V	Johns *et al*., 1992; Mackey and Howell, 1992
m.3733G>A	*ND1*	E143K	Valentino *et al*., 2004
m.4171C>A	*ND1*	I289M	Kim *et al*., 2002
m.10663T>C	*ND4*	V65A	Brown *et al*., 2002
m.14459G>A	*ND6*	A72V	Jun *et al*., 1994
m.14482C>G m.14482C>A	*ND6*	M64I	Howell *et al*., 1998b Velentino *et al*., 2002
m.14495A>G	*ND6*	L60S	Chinnery *et al*., 2001
m.14568C>T	*ND6*	G36S	Besch *et al*., 1999

A frequência de cada uma destas mutações varia consideravelmente de acordo com a localização geográfica (Man *et al*., 2002). No entanto, a mutação m.11778G>A tem sido descrita como sendo a mais comum, estando presente em 50% dos casos de LHON (Guy *et al*., 2008). Esta leva à troca de uma arginina, altamente conservada, para uma histidina no aminoácido 340 da subunidade 4 da NADH desidrogenase da CRM. A mutação m.3460G>A tem como consequência a alteração do aminoácido alanina para treonina, na posição 52 da subunidade 1 da NADH desidrogenase. Por sua vez, a mutação m.14484T>C substitui uma metionina por uma valina no aminoácido 64 da subunidade 6 da mesma proteína (Yen *et al*., 2006). Outras mutações patogénicas no mtDNA associadas à doença têm sido descritas, sendo os genes *ND1* e *ND6* considerados *hotspots* mutacionais devido ao facto de albergarem duas das três mutações primárias, bem como outras pertencentes ao "top 10" e várias mutações raras (Man *et al*., 2011a).

A maioria dos doentes com LHON possui uma mutação no mtDNA em homoplasmia, sendo a percentagem de casos em que é verificada heteroplasmia de apenas 14% (Smith *et al*., 1993). Entre os portadores de mutações heteroplásmicas, verifica-se perda visual apenas quando o conteúdo de mtDNA mutado é superior a 60%, sendo este o limite descrito para que ocorram anomalias bioenergéticas (Man *et al*., 2002). Em termos clínicos, não se verificam diferenças entre doentes homoplásmicos ou heteroplásmicos (Koilkonda & Guy, 2011).

Todos os genes mitocondriais envolvidos na doença codificam subunidades do complexo I da CRM, causando disfunção da mesma (figura 3). Um estudo bioquímico publicado no ano 2000 por Brown e colaboradores, avaliou a função do complexo I em células portadoras das três mutações primárias mais comuns associadas à LHON. Verificou-se uma grande redução da função do complexo I para a mutação m.3460G>A, intermédia para a mutação m.11778G>A e ligeira para a mutação m.14484T>C (Brown *et al*., 2000). Assim, as mutações m.3460G>A e m.11778G>A são consideradas mais graves, em comparação com a m.14484T>C, e os doentes portadores desta última apresentam maior probabilidade de recuperação visual (Tońska *et al*., 2010).

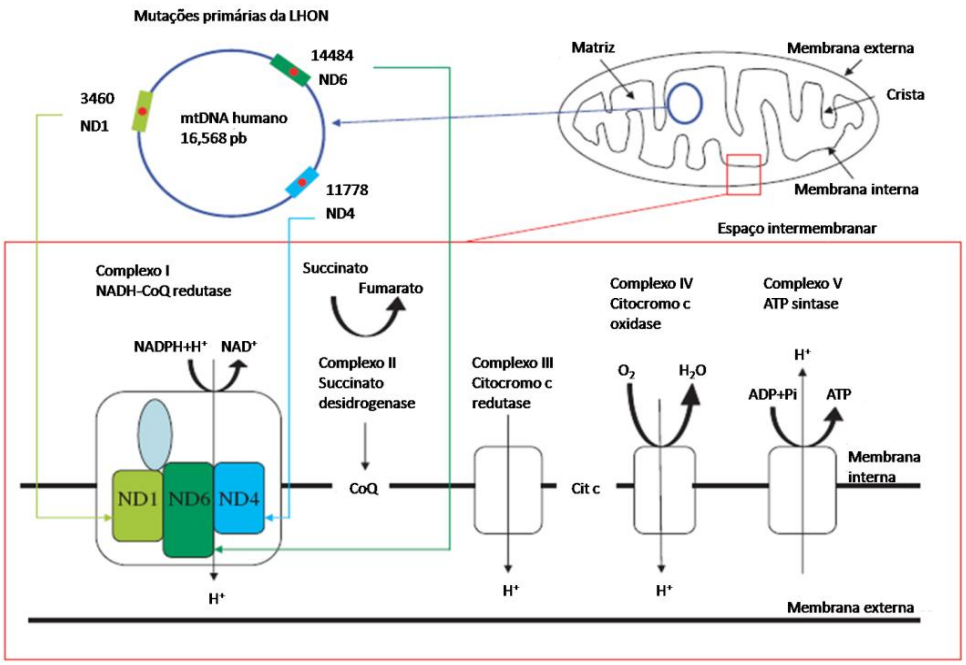

Figura 3. Mutações primárias da LHON e disfunção do complexo I.
As três mutações primárias associadas à LHON nas posições 3460, 11778 e 14484 do mtDNA afetam os genes codificantes das subunidades do complexo 1 da CRM *ND1*, *ND4* e *ND6*, respetivamente (adaptado de Yen *et al*., 2006).

A mutação no mtDNA associada à LHON considerada mais grave é a m.14459G>A, que tem como consequência uma variabilidade de fenótipos clínicos, causando LHON-*plus*, na maioria dos casos. Esta mutação altera uma alanina para uma valina, localizada na região com maior conservação evolutiva do gene *ND6* (Gropman *et al*., 2004). Para além desta, outras mutações têm sido associadas a fenótipos mais graves, nomeadamente: m.4160T>C, m.11696A>G e m.14596T>A (Howell *et al*., 1991; De Vries *et al*., 1996).

A mutação m.3376G>A que afeta o complexo I da CRM foi identificada como causadora da síndrome de sobreposição que se caracteriza pelo desenvolvimento de sintomas caraterísticos da LHON e da MELAS conjuntamente (Blakely *et al*., 2005). Por sua vez, a presença de esclerose múltipla em doentes com LHON está preferencialmente associada à mutação m.11778G>A, embora este fenótipo já tenha sido observado em associação com outras mutações primárias (Man *et al*., 2011a). Está também descrito na literatura o caso de um doente com a mutação m.11778G>A e múltiplas deleções no mtDNA que desenvolveu oftalmoplegia externa progressiva (PEO) e LHON. Este é um caso verdadeiramente atípico uma vez que a ocorrência de duas mutações patogénicas no mtDNA é extremamente rara (Melberg *et al*., 2009).

Nem todos os portadores das mutações no mtDNA anteriormente descritas desenvolvem perda visual, verificando-se que, até mesmo familiares com a mesma mutação homoplásmica, apresentam

fenótipos distintos. Está descrito também que apenas aproximadamente 50% dos homens e 10% das mulheres que possuem uma das três mutações associadas à LHON desenvolvem a doença. Deste modo, é evidenciada a "penetrância" incompleta das mutações no mtDNA, sugerindo que outros fatores genéticos, mitocondriais ou nucleares, poderão estar envolvidos na etiologia da LHON, bem como a regulação epigenética (Yen *et al*., 2006).

Um fator que parece ter influência na expressão da LHON está relacionado com os haplogrupos do mtDNA. Está descrito que o haplogrupo europeu J está preferencialmente associado às mutações m.11778G>A e m.14484T>C, bem como a uma elevada "penetrância" das mesmas. Consequentemente, este haplogrupo está relacionado com um maior risco de perda visual. Por outro lado, a mutação m.3460G>A apresenta uma distribuição aleatória pelos haplogrupos, havendo, no entanto, uma maior probabilidade de ocorrer perda visual quando esta se encontra associada ao haplogrupo K (Torroni *et al*., 1997; Man *et al*., 2009a). Há também evidências de que as três mutações previamente mencionadas possuem uma baixa penetrância quando estão presentes em conjunto com o haplogrupo H (Howell *et al*., 2003). Estes dados são indicadores de que polimorfismos específicos no mtDNA, não deletérios por si só, podem modificar o potencial patogénico das mutações da LHON, aumentando o risco de expressão da doença ou causando uma evolução clínica mais grave (Chinnery *et al*., 1999; Yen *et al*., 2006; Pello *et al*., 2008).

Recentemente, têm vindo a ser realizados estudos com o objetivo de identificar genes nucleares que contribuam para a penetrância variável das mutações da LHON no mtDNA. Neste sentido, um estudo publicado em 2010 identificou uma região no cromossoma 3 (3q26.2-3q28) possivelmente relacionada com a perda visual em portadores das mutações primárias associadas à LHON. Nesta região estão incluídos os genes *SLC7A14*, *MFN1*, *MRPL47*, *MCCC1*, *PARL* e *OPA1*. O mesmo estudo, referente a doentes tailandeses, associou duas variações genéticas no gene *PARL* (*rs3749446* e *rs1402000*) à expressão da doença (Phasukkijwatana *et al*., 2010). Contudo, num estudo posterior relativo a doentes chineses, não foi possível estabelecer uma associação entre as variações genéticas anteriormente referidas e a manifestação da doença (Zhang *et al*., 2010).

Variações no gene *MAPT*, que codifica a proteína tau, estão associadas a várias doenças neurodegenerativas, bem como à alteração da função da CRM. Assim, foi colocada a hipótese de que alterações neste gene poderão contribuir para o risco de cegueira em portadores das mutações primárias associadas à LHON. Contudo, não foi possível estabelecer uma relação entre variações de sequência no gene *MAPT* e a perda de visão em portadores de mutações no mtDNA (Hudson *et al*., 2011).

Os fatores ambientais podem também contribuir para a penetrância das mutações associadas à LHON, havendo vários estudos evidenciando, por exemplo, que o consumo de álcool e tabaco aumenta o risco de perda visual em portadores das mutações no mtDNA (Chalmers & Harding, 1996; Tsao *et al*., 1999; Sadun *et al*., 2003). Estão descritos na literatura cinco pares de gémeos monozigóticos portadores de uma mutação primária, verificando-se discordância na manifestação da doença em dois casos, o que evidencia a contribuição dos fatores ambientais. A privação nutricional, exposição a toxinas industriais, fármacos antirretrovirais, stresse fisiológico ou doença aguda também podem precipitar a manifestação da doença (Johns *et al*., 1993; Biousse *et al*., 1997; Man et al., 2009a).

Uma das particularidades da LHON, ausente noutras doenças mitocondriais, é a sua elevada incidência no sexo masculino. Esta depende do tipo de mutação e não pode ser explicada através da genética mitocondrial, permanecendo ainda desconhecidas as bases moleculares subjacentes a este facto. A razão de doentes do sexo masculino para sexo feminino é de 3:1, 4-6:1 e 8:1 em portadores das mutações m.3460G>A, m.11778G>A e m.14484T>C, respetivamente (Yen *et al*., 2006). Esta predominância masculina da doença pode ser devida a fatores genéticos ou ambientais bem como a características anatómicas, hormonais ou fisiológicas (Koilkonda & Guy, 2011). O padrão de segregação da doença é consistente com a presença, no cromossoma X, de um gene de suscetibilidade à perda visual que atue em sinergia com as mutações do mtDNA. Os portadores masculinos, ao possuírem apenas um cromossoma X, não podem compensar a presença do hipotético alelo, ao contrário do que se verifica no sexo feminino (Man *et al*., 2011a). Contudo, esta hipótese não permite uma explicação completamente coerente, uma vez que, assim sendo, todos os filhos de mulheres afetadas desenvolveriam a doença, o que não se verifica. Porém, isto poderá dever-se à inativação do cromossoma X (lionização), sendo que mulheres cegas que possuam o "alelo protetor" silenciado podem ter filhos não afetados, pois o padrão de metilação é eliminado durante o desenvolvimento embrionário (Hudson *et al*., 2007).

1.2.1.3. Mecanismos fisiopatológicos

Apesar das mutações no mtDNA estarem presentes em todas as células da retina, são essencialmente as células ganglionares, no feixe papilo-macular, que se encontram mais afetadas na LHON. A razão do atingimento de apenas este tipo celular ainda não é totalmente conhecida, mas pode dever-se à sua elevada necessidade energética, tendo em conta os seus longos axónios e a presença de regiões não mielinizadas (Schoeler *et al*., 2007; Koilkonda & Guy, 2011).

Os mecanismos patogénicos subjacentes à LHON ainda não são totalmente conhecidos; no entanto, uma vez que é evidente a sua associação a mutações no mtDNA, a explicação mais óbvia seria que,

em consequência das mesmas, se verificasse um decréscimo da produção de energia e, consequentemente, disfunção do nervo ótico. Contudo, o ligeiro decréscimo na produção energética causado por algumas das mutações no mtDNA não explica os efeitos fenotípicos observados. Para além disso, embora o sistema nervoso central seja muito dependente do ATP mitocondrial, estudos de bioenergética da visão não revelam que a função das CGR seja maioritariamente dependente da produção de energia mitocondrial. Estas observações levam a especular que a patogénese da LHON poderá não ser devida a efeitos diretos ao nível do sistema de OXPHOS, mas sim a mecanismos mais indiretos. Assim, explicações alternativas como o stresse oxidativo, apoptose ou alteração do transporte axonal dos organelos têm vindo a ser propostas (Howell *et al*., 1998a; Newman, 2002; Tońska *et al*., 2010).

Os complexos I e III da CRM são responsáveis pela maior parte dos aniões superóxido formados na mitocôndria (Kudin *et al*., 2004). Assim, as mutações patogénicas que induzem disfunção do complexo I causam um aumento da produção de ROS (Pitkänen & Robinson, 1996). Num estudo publicado em 1999, foram analisadas as consequências fisiológicas a nível celular da inibição parcial do complexo I, concluindo que a morte celular observada está preferencialmente associada à produção de radicais livres e não ao decréscimo da função respiratória (Barrientos & Moraes, 1999). Foi também observado um aumento significativo na produção de ROS em cíbridos portadores das mutações m.11778G>A e m.3460G>A, associadas aos fenótipos de LHON mais graves (Wong *et al*., 2002). Em concordância, um estudo posterior permitiu concluir que cíbridos portadores das mutações anteriormente referidas possuem uma diminuição das defesas antioxidantes (Floreani *et al*., 2005). Estas evidências apoiam o facto de as ROS constituírem um fator chave na patogénese da LHON, possivelmente por favorecerem a abertura do poro de transição mitocondrial (Yen *et al*., 2006; Kirches, 2011).

A alteração da função do complexo I tem efeitos ao nível da apoptose, nomeadamente aumentando a sensibilidade das células à mesma (Yen *et al*., 2006). Assim, já foi demonstrado que células de doentes com LHON possuem uma taxa de apoptose mais elevada comparativamente aos controlos (Battisti *et al*., 2004). O aumento da libertação de citocromo c para o citosol, observado em cíbridos de LHON, constitui um outro factor que indica que a mitocôndria estará envolvida na activação da cascata apoptótica na doença. Assim, Ghelli e colaboradores (2003) propõem a hipótese de que as mutações primárias associadas à LHON afetam a interação do complexo I com os substratos da ubiquinona, influenciando a abertura do poro de transição mitocondrial. Consequentemente, há libertação do citocromo c e ativação da cascata apoptótica.

A depleção energética verificada em consequência da disfunção mitocondrial pode conduzir a alterações ao nível do transporte axonal dos organelos, uma vez que este é realizado por proteínas

motoras que requerem grande quantidade de ATP para o seu funcionamento. Assim, as proteínas sintetizadas no citoplasma das CGR, bem como as mitocôndrias que não são transportadas ao longo dos axónios em direção ao cérebro, podem contribuir para a degenerescência visual verificada na LHON (Koilkonda & Guy, 2011). Esta hipótese é reforçada pelo facto de existirem evidências de que é necessária a rede mitocondrial no nervo ótico, de modo a assegurar a transmissão do potencial de ação ao longo dos axónios, particularmente nas regiões não mielinizadas ricas em mitocôndrias (Delettre *et al*., 2002). O diagrama da figura 4 resume as vias potencialmente envolvidas na degenerescência do nervo ótico, que ocorre na LHON.

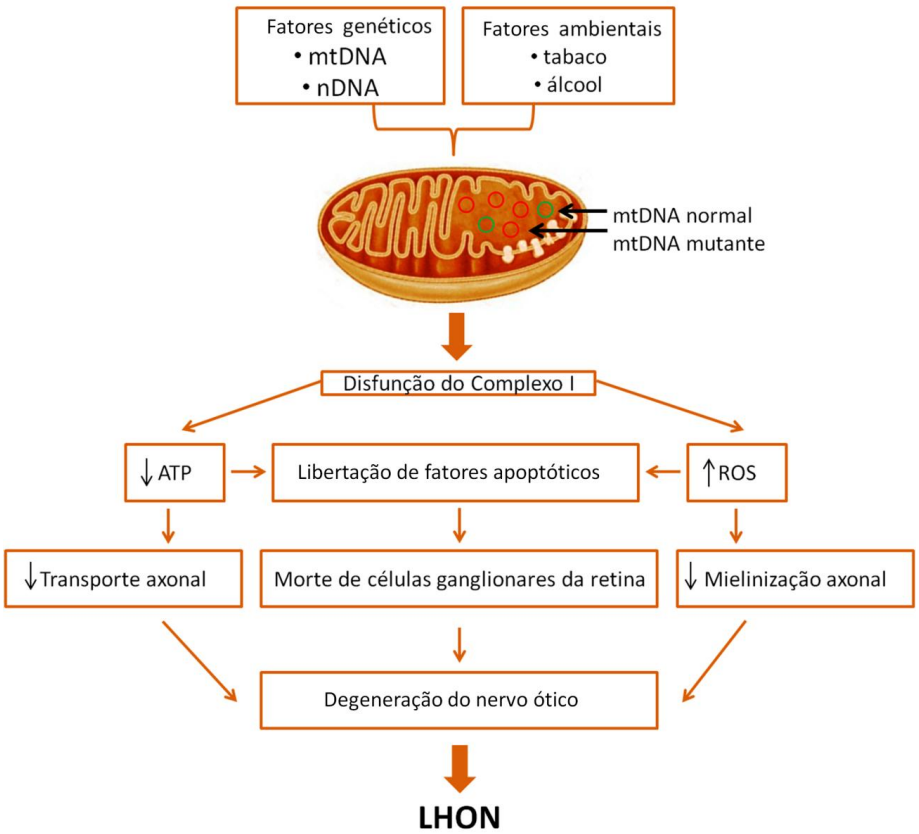

Figura 4. Diagrama esquemático ilustrando a interação entre os diversos eventos que culminam com a degenerescência do nervo ótico na LHON (Koilkonda & Guy, 2011)

Um estudo publicado por Abu-Amero e colaboradores (2010), no qual se analisou a expressão de diversos genes relacionados com a função mitocondrial em doentes com LHON portadores da mutação m.11778G>A, permitiu concluir que o gene *OPA1* se encontrava *downregulated* em todos os doentes.

1.3. Gene *OPA1*

O gene *OPA1*, localizado no cromossoma 3 (3q28), é constituído por 31 exões, abrangendo mais de 114 Kb do nDNA. O último exão é "não codificante" e o *splicing* alternativo dos exões 4, 4b e 5b dá origem a oito isoformas diferentes (Delettre *et al*., 2002). A isoforma principal (isoforma 1) possui 2.880 nucleótidos, estando ausentes os exões 4b e 5b, e codifica uma proteína com 960 aminoácidos. Por sua vez, a isoforma mais longa, que inclui todos os exões alternativos, codifica uma proteína com 1015 aminoácidos (Amati-Bonneau *et al*., 2009). O gene é expresso de forma ubíqua nos tecidos humanos, embora mais abundantemente na retina, cérebro, fígado, coração e pâncreas (Landes *et al*., 2010). No entanto, existem variações na expressão de *OPA1* ao nível dos tecidos para as diferentes isoformas (Delettre *et al*., 2001).

A proteína OPA1 pertence a uma grande família de mecanoenzimas, as dinaminas, caracterizadas por possuírem um domínio dinamina-GTPase muito conservado e um tamanho que varia entre os 60 e 100 kDa (Delettre *et al*., 2002; Man *et al*., 2011a). A proteína em questão possui um domínio C-terminal efetor, envolvido na oligomerização e ativação catalítica. Por sua vez, na região N-terminal está presente uma sequência de endereçamento para a mitocôndria que, após a importação, é removida pela peptidase de processamento mitocondrial (PPM). A localização mitocondrial da OPA1 restringe-se ao espaço intermembranar, verificando-se que esta interage com ambas as membranas mitocondriais, embora mais fortemente com a MIM. A sequência de endereçamento mitocondrial é seguida por um, dois ou três domínios transmembranares e por um ou dois domínios *coiled-coil*, consoante a isoforma (figura 5) (Olichon *et al*., 2007b; Landes *et al*., 2010).

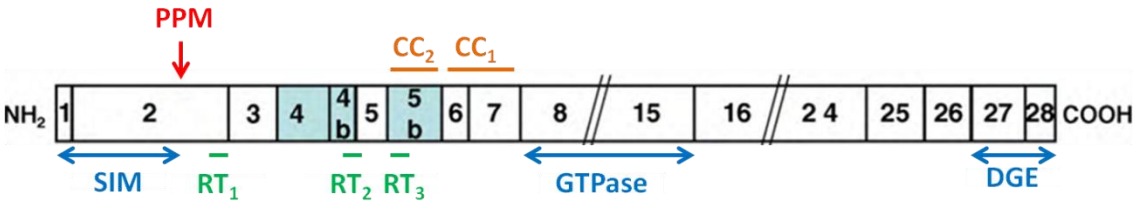

Figura 5. Representação esquemática do gene *OPA1* e da estrutura da OPA1.
A proteína possui um domínio GTPase e um domínio GTPase efetor (DGE). Na região N-terminal existe uma sequência de importação para a mitocôndria (SIM) que é clivada pela PPM. Segue-se a região transmembranar 1 (RT_1) que está presente em todas as isoformas à semelhança do domínio *coiled-coil* 1 (CC_1). As regiões transmembranares 1 e 2 (RT_2 e RT_3) e o domínio *coiled-coil* 2 (CC_2) estão presentes apenas nas isoformas que possuem os exões alternativos respetivos (identificados a azul). Os números correspondem aos exões do gene *OPA1* (adaptado de Landes *et al*., 2010).

Para além do processamento efetuado pela PPM, a proteína possui um ou dois locais de clivagem adicionais, consoante a isoforma que lhe deu origem. Assim, os oito mRNAs de *OPA1* podem originar uma isoforma longa, derivada apenas da clivagem da PPM, e uma ou mais isoformas curtas em consequência da clivagem nos outros dois locais (Figura 6). As proteases que atuam nestes locais permanecem ainda desconhecidas (Song *et al*., 2007). Ambas as isoformas da proteína, longa e curta, estão associadas às membranas mitocondriais. No entanto, há evidências de que as isoformas longas estão ancoradas à MIM, enquanto as isoformas curtas se ligam à sua periferia, o que lhes permite difundir no espaço intermembranar e associar-se à membrana externa mitocondrial MEM (Landes *et al*., 2010).

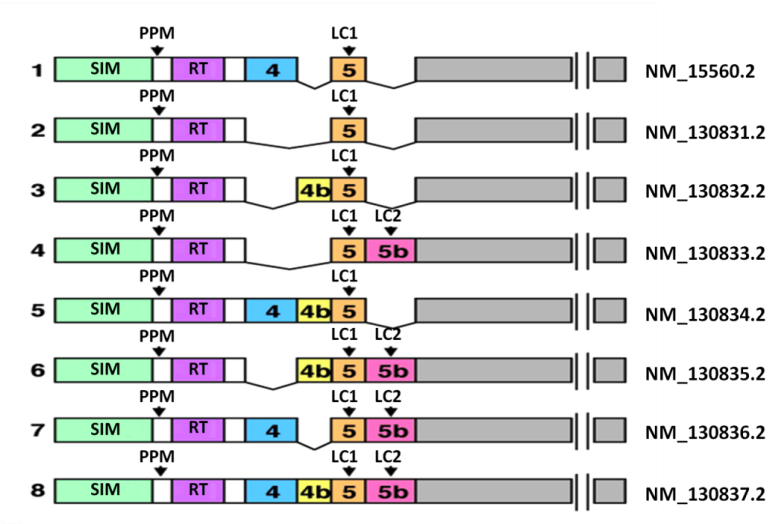

Figura 6. Esquema representativo das oito isoformas da proteína OPA1.
A clivagem da SIM pela PPM leva à formação das isoformas longas. A clivagem adicional nos locais de clivagem (LC) 1 (exão 5) e 2 (exão 5b) origina as isoformas curtas. Do lado direito encontram-se os códigos referentes ao mRNA de cada uma das isoformas, de acordo com a nomenclatura NCBI (adaptado de Song *et al*., 2007).

Até à data, são várias as funções atribuídas a esta proteína (figura 7), nomeadamente um efeito mediador da fusão mitocondrial, manutenção das cristas mitocondriais e, consequentemente, da morfologia mitocondrial, manutenção do mtDNA e regulação da apoptose e do processo de OXPHOS (Votruba, 2004; Cohn *et al*., 2007; Landes *et al*., 2010; Man *et al*., 2011a).

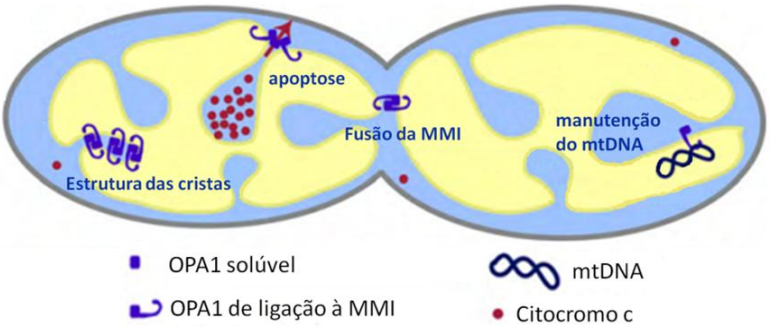

Figura 7. Imagem representativa das funções da proteína OPA1: manutenção das cristas, regulação da apoptose, fusão mitocondrial e manutenção do mtDNA (adaptado de Landes *et al*., 2010).

A fusão mitocondrial é um processo que controla a morfologia do organelo e é crítico para a manutenção da função da rede mitocondrial. São necessárias três proteínas para que ocorra a fusão mitocondrial, um processo que envolve a fusão coordenada de ambas as membranas interna e externa da mitocôndria e que culmina com uma mistura dos componentes da matriz. A fusão da MEM requer as proteínas integrais da mesma, nomeadamente Mfn1 e Mfn2. Por sua vez, a fusão da MIM requer a proteína OPA1, sendo necessária uma combinação das isoformas longas de ligação à MIM e das isoformas mais curtas e solúveis. A disrupção do processo de fusão resulta em fragmentação mitocondrial e, consequentemente, pode ocorrer perda de moléculas de mtDNA por mecanismos ainda desconhecidos. Deficiências ao nível da fusão mitocondrial têm também como consequência uma função respiratória diminuída (Okomoto & Shaw, 2005; Song *et al*., 2009; Ban *et al*., 1010).

Diversos estudos de microscopia eletrónica convencional demonstraram que células contendo as proteínas OPA1 ou a sua homóloga na levedura, mgm1p, *downregulated*, apresentam cristas com morfologia anormal (Olichon *et al*., 2003; Amutha *et al*., 2004). Foi posteriormente comprovado por Frezza e colaboradores (2006) que a proteína OPA1 está também envolvida na remodelação das cristas durante a apoptose. A mitocôndria está envolvida na regulação da apoptose através da libertação de moléculas pró-apoptóticas, nomeadamente o citocromo c, que se localiza no espaço "intra-cristas". Para tal, é necessário que ocorra a remodelação das cristas, um processo no qual há abertura das junções que as mantêm unidas. Deste modo, comprovou-se que a proteína OPA1, nomeadamente na forma de complexos constituídos por isoformas longas e curtas, é responsável por assegurar estas junções, regulando assim a mobilização do citocromo c e, consequentemente, a sua libertação para o espaço intermembranar. De acordo com estes dados, a *downregulation* da

proteína OPA1, ou a expressão de mutantes patogénicos, aumenta a sensibilidade das células à apoptose (Lee *et al*., 2004; Olichon *et al*., 2007b).

Um estudo publicado em 2008 demonstrou que a OPA1 está também envolvida na regulação da OXPHOS por interação direta com os complexos da CRM, controlando a sua organização e facilitando o fluxo de eletrões (Zanna *et al*., 2008; Man *et al*., 2011a). Já foi demonstrado que a síntese de ATP se encontra diminuída em fibroblastos de cultura com mutações patogénicas no gene *OPA1* (Amati-Bonneau *et al*., 2005; Chevrollier *et al*., 2008).

Em 2008, dois estudos publicados, apresentaram evidências de que a proteína OPA1 está envolvida na manutenção da estabilidade do mtDNA, verificando-se que mutações no gene *OPA1* podem conduzir ao aparecimento de deleções múltiplas no mtDNA (Amati-Bonneau *et al*., 2008; Hudson *et al*., 2008). No entanto, é desconhecido o mecanismo pelo qual isto acontece, sabendo-se que, provavelmente, o gene *OPA1* não está diretamente envolvido na replicação do mtDNA. Assim, as alterações verificadas ao nível do mtDNA podem estar relacionadas com o papel que a proteína desempenha ao nível da estrutura e organização da MIM. Foi então proposta a teoria explicativa de que as alterações verificadas na morfologia das cristas mitocondriais, em consequência de mutações no gene *OPA1*, podem perturbar a ancoragem do mtDNA à MIM e, deste modo, influenciar a sua replicação e expressão (Landes *et al*., 2010). Um estudo publicado por Kim e colaboradores (2005) apresentou resultados sugestivos de que a proteína OPA1 também pode estar envolvida na regulação da quantidade de moléculas de mtDNA, uma vez que verificaram uma diminuição destas em linfócitos de doentes portadores de mutações neste gene.

Existem já mais de 200 mutações patogénicas identificadas no gene *OPA1*, estando estas presentes em cerca de 50 a 60% dos doentes com ADOA (Man *et al*., 2011a). A principal característica que distingue esta doença da LHON é o tempo de duração do processo degenerativo. Na LHON este ocorre de forma aguda com perda marcada de CGR, enquanto na ADOA este é um processo lento e progressivo. Existem evidências de que os mecanismos patogénicos subjacentes a ambas as doenças possuem etapas comuns (Zanna *et al*., 2008).

As mutações pontuais no gene *OPA1* localizadas nas regiões que codificam os domínios GTPase (exões 8 a 15) e dinamina (exões 16 a 23) da proteína são as mais comuns. A maioria das mutações neste gene resulta em codões de terminação prematuros, com formação de mRNAs truncados que são instáveis e, frequentemente, degradados por mecanismos de proteção celular. Assim, a redução dos níveis da proteína aparenta ser a causa predominante da ADOA (Pesch *et al*., 2001; Man *et al*., 2011a). Contudo, cerca de 30% das mutações no gene *OPA1* são mutações *missense* na região codificante, ou próxima do domínio GTPase (figura 8). Estas alteram aminoácidos muito conservados,

provavelmente necessários para a atividade de GTPase da proteína. Nestes casos, o efeito patogénico é devido, possivelmente, à perda de atividade, ficando a função da proteína comprometida (Delettre *et al*., 2002; Amati-Bonneau *et al*., 2008; Man et al., 2009a). No entanto, os mecanismos patológicos subjacentes a ADOA podem diferir consoante o domínio da proteína afetado (Amati-Bonneau *et al*., 2009).

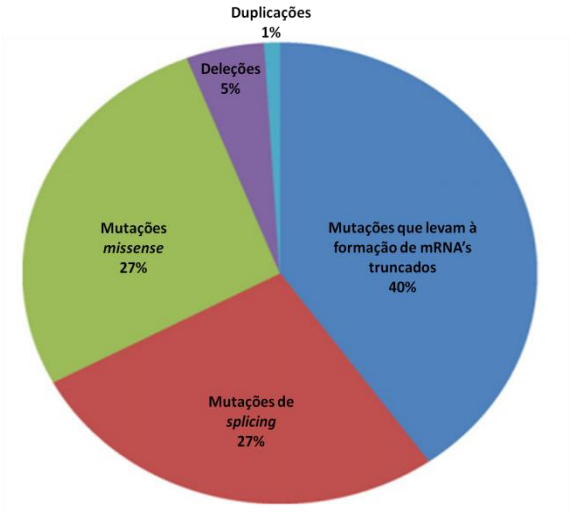

Figura 8. Gráfico representativo da distribuição do tipo de mutações patogénicas no gene *OPA1* (adaptado de Amati-Bonneau *et al*., 2009).

Cerca de 10% dos doentes com mutações no gene *OPA1* possuem sintomas extraoculares em associação com neuropatia ótica. Deste modo, é evidenciado o papel da OPA1 também ao nível de doenças multissistémicas. Assim, encontra-se descrito na literatura o caso de um doente portador de uma mutação que afeta o domínio dinamina da proteína e que desenvolveu esclerose múltipla e atrofia ótica, reforçando as semelhanças na expressão clínica entre os fenótipos *plus* da ADOA e da LHON (Verny *et al*., 2008; Amati-Bonneau *et al*., 2009). Por sua vez, uma mutação localizada no exão 14, que codifica parte do domínio GTPase, foi associada à presença de surdez em conjunto com as anomalias visuais (Amati-Bonneau *et al*., 2003; Shimizu *et al*., 2003). Em 2008, foi descrito uma síndrome associada a mutações *missense* no gene *OPA1*, que se carateriza pelo desenvolvimento de atrofia ótica em idades muito jovens, com aparecimento posterior, na idade adulta, de PEO crónica, ataxia, surdez sensorioneural, neuropatia sensório-motora e miopatia. Estes doentes apresentam múltiplas deleções no mtDNA, o que está de acordo com a função que a OPA1 possui ao nível da sua manutenção (Amati-Bonneau et al., 2008; Hudson et al., 2008).

Polimorfismos no gene OPA1 foram também relacionados com um risco aumentado de desenvolver glaucoma de tensão normal, apenas em alguns grupos étnicos (Aung *et al*., 2002; Powell *et al*., 2003; Woo *et al*., 2004; Man *et al*., 2010c).

1.4. Gene *OPA3*

O gene *OPA3* (figura 9), localizado no cromossoma 19, região q13.2-q13.3, é constituído por três exões e possui duas isoformas. O exão 1 é comum a ambas, enquanto o exão 2 e o exão 3 são exclusivos, cada um, de uma das isoformas. As sequências nucleotídicas dos exões 2 e 3 são semelhantes, sugerindo a possibilidade de ocorrência de duplicação mediada por um transposão *long interspersed element*-1 (LINE-1), presente na sequência intrónica, a montante do exão 2 (Huizing *et al*., 2010).

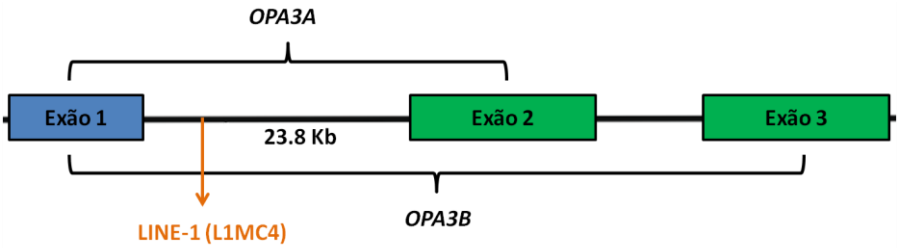

Figura 9. Representação esquemática do gene *OPA3*.
A verde estão representados os exões alternativos. O transposão LINE-1 (L1MC4), localizado cerca de 24 Kb a montante do exão 2 pode levar à formação do exão 3 por duplicação (adaptado de Huizing *et al*., 2010).

Ambas as isoformas do gene *OPA3* apresentam expressão ubiquitária. No entanto, a *OPA3B* possui níveis de expressão inferiores a *OPA3A*, razão pela qual já foi colocada a hipótese de que a proteína codificada por esta isoforma não será, provavelmente, muito relevante para as células humanas. Para além disso, a *OPA3A* é expressa e conservada dos fungos aos primatas, enquanto *OPA3B* é exclusivamente encontrada em primatas. Em concordância com isto, não é conhecida nenhuma mutação em *OPA3B* associada ao desenvolvimento de doença em humanos (Huizing et al., 2010).

As proteínas OPA3A e OPA3B são constituídas por 179 e por 180 aminoácidos, respetivamente (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80207). Ambas possuem 47 aminoácidos no N-terminal, codificados pelo exão 1, e as sequências da região C-terminal apresentam elevada homologia. A proteína OPA3 apresenta uma sequência de endereçamento para a mitocôndria na região N-terminal e, na região C-terminal, tem uma possível sequência de endereçamento para o peroxissoma (Huizing *et al*., 2010). Contudo, um estudo recente demonstrou que a proteína OPA3 não se localiza neste

organelo, sendo a sua localização unicamente mitocondrial (Powell *et al*., 2011). Em 2010, a OPA3 foi identificada como sendo uma proteína integral da MEM, apresentando-se com as regiões N-terminal e C-terminal expostas para o espaço intermembranar e citoplasma, respetivamente (Ryu *et al*., 2010).

Em 2001, Anikster e colaboradores identificaram a primeira mutação patogénica no gene *OPA3*, em homozigotia, no intrão 1 da isoforma *OPA3A*, que altera o *splicing*. Esta leva à abolição completa dos níveis da proteína em fibroblastos, sendo causadora da síndrome de Costeff em doentes cuja idade de início da atrofia ótica foi precoce e que manifestaram sintomas neurológicos no início da adolescência (Anikster *et al*., 2001). Em 2002, foi identificada a segunda mutação patogénica no gene *OPA3* associada também à síndrome de Costeff. Trata-se de uma deleção homozigótica de 18 pb no exão 2 da isoforma *OPA3A*, resultando na deleção de seis aminoácidos e, consequentemente, na perda de função da proteína (Kleta *et al*., 2002; Davies *et al*., 2008). Em ambos os casos, a expressão de *OPA3B* encontra-se significativamente aumentada. No entanto, é mais provável que a diminuição dos níveis de OPA3A esteja na causa da doença, ao invés do aumento de OPA3B (Huizing et al., 2010). A terceira mutação conhecida no gene *OPA3* associada à síndrome em questão é uma mutação nonsense no exão 2 da isoforma *OPA3A* (Ho et al., 2008).

Em 2004 foram descritas no exão 2 de *OPA3A* duas mutações *missense*, heterozigóticas, presentes em doentes com ADOAC. Ambas alteram aminoácidos conservados e estão ausentes em indivíduos saudáveis. Observou-se que fibroblastos portadores destas mutações tinham uma sensibilidade aumentada à apoptose (Reynier et al., 2004). Assim, desconhece-se a razão pela qual os doentes com síndrome de Costeff não desenvolvem cataratas. Contudo, Powell e colaboradores supõem que poderá dever-se ao facto das mutações que estão na base da ADOAC afetarem domínios chave da proteína que prejudicam funções celulares específicas, conduzindo ao desenvolvimento de cataratas (Powell *et al*., 2011).

Mutações no gene *OPA3* podem ser responsáveis por atrofias óticas autossómicas dominantes ou recessivas. Mutações homozigóticas com consequente perda de função da proteína conduzem a doenças multissistémicas, nomeadamente à síndrome de Costeff, enquanto mutações *missense* heterozigóticas resultam em fenótipos menos agressivos, como ADOAC (Reynier *et al*., 2004). O desenvolvimento de atrofia ótica bilateral, com idade de início precoce, é uma característica comum a ambas as doenças relacionadas com mutações em *OPA3* (Davies *et al*., 2008). A tabela 3 reúne as mutações patogénicas identificadas até à data no gene em questão.

Tabela 3. Mutações patogénicas no gene *OPA3*

Fenótipo	Mutação	Hereditariedade	Referência
Síndrome de Costeff	c.143-1G>C	Autossómica Recessiva	Anikster *et al*., 2001
Síndrome de Costeff	c.320_337del (p.Gln108_Glu113del)	Autossómica Recessiva	Kleta *et al*., 2002
Síndrome de Costeff	c.415C>T (p.Gln139*)	Autossómica Recessiva	Ho *et al*., 2008
ADOAC	c.277G>A (p.Gln93Ser)	Autossómica Dominante	Reynier *et al*., 2004
ADOAC	c.313C>G (p.Gln105Glu)	Autossómica Dominante	Reynier *et al*., 2004

A função da proteína OPA3 e o mecanismo pelo qual as mutações neste gene levam ao desenvolvimento da síndrome de Costeff e da ADOAC permanece ainda desconhecido. Contudo, um estudo conduzido por Ryu e colaboradores (2010) apresentou evidências de que a OPA3 possui um papel ao nível da regulação da dinâmica mitocondrial e da apoptose. Verificou-se que a depleção da proteína induz alongamento das mitocôndrias, sugerindo que esta poderá ser um fator de fissão mitocondrial ou um inibidor da fusão. Um estudo publicado posteriormente por Powell e colaboradores (2011) mostrou que as mitocôndrias de um modelo animal de síndrome de Costeff possuíam alterações na morfologia das cristas. Para além disso verifica-se um aumento da sensibilidade à apoptose em células com mutações no gene *OPA3*. Contudo, a proteína por si só não possui uma ação pró-apoptótica, podendo no entanto potenciar a morte celular via fragmentação mitocondrial. Existem também evidências de que a proteína OPA3 é necessária para a manutenção dos níveis de ácido 3-metil-glutacónico, embora o mecanismo exato pelo qual isto se verifica permaneça ainda desconhecido. Pei e colaboradores sugerem que esta proteína facilita, de algum modo, o *uptake* do ácido do citosol para a mitocôndria (Pei *et al*., 2010).

Tendo em conta o que foi acima exposto, as causas genéticas subjacentes à LHON e os mecanismos fisiopatológicos que levam à doença têm ainda pontos em aberto por esclarecer. O presente trabalho pretende contribuir para esse esclarecimento através do estudo dos genes *OPA1* e *OPA3* numa família portadora da mutação m.11778G>A, em que a probanda apresenta LHON-*plus* e é o único membro afetado.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho consiste na identificação de variações de sequência genéticas que permitam explicar a "penetrância" incompleta das mutações no mtDNA associadas à LHON, nomeadamente a fenótipos *plus*.

Com este prepósito analisou-se a sequência dos genes *OPA1* e *OPA3*, que codificam proteínas mitocondriais e estão relacionados com o desenvolvimento de outras atrofias óticas e defeitos neurológicos, numa família cujos membros da linhagem materna possuem a mutação m.11778G>A. Esta manifesta penetrância incompleta, verificando-se que apenas um dos portadores desenvolveu a doença, apresentando um fenótipo atípico com características de LHON-*plus*. Deste modo pretendeu-se encontrar variações de sequência que permitissem explicar a diferença fenotípica entre a probanda e os restantes portadores da mutação m.11778G>A.

As alterações genéticas identificadas na probanda que têm como consequência a alteração de aminoácido na sequência da proteína ou que se localizam em regiões reguladoras, nomeadamente na 3'UTR, foram analisadas em amostras de indivíduos saudáveis e de outros doentes com LHON clássica. Deste modo, este estudo pretendeu também averiguar a relação entre variações de sequência no gene *OPA1* e a manifestação da LHON não apenas na probanda, mas também em doentes com LHON comum, cujos sintomas se restringem às anomalias visuais.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Foram usadas amostras de DNA, previamente extraído, maioritariamente a partir de sangue periférico, no Laboratório de Bioquímica Genética através de métodos padronizados. A amostragem encontra-se dividida em três grupos distintos, que se descreve em seguida.

3.1.1. Família 1

A probanda desta família é portadora da mutação m.11778G>A homoplásmica em linfócitos, fibroblastos e músculo. Esta desenvolveu um fenótipo *plus* bastante grave e atípico, nomeadamente ao nível da idade de início da doença, género e evolução dos sintomas neurológicos (Grazina *et al*., 2007).

Aos oito meses de idade a doente já apresentava uma redução da acuidade visual, sendo posteriormente confirmada a atrofia ótica bilateral, verificando-se uma perda de visão grave. Esta possui também estrabismo, nistagmo e PEO. As anomalias extraoculares incluem epilepsia, ataxia, hipotonia, sinais extrapiramidais, ausência de linguagem e anomalias no ritmo respiratório. A doente apresenta lesões no tálamo, gânglio basal e córtex cerebral (Grazina *et al*., 2007).

A presença da mutação m.11778G>A foi confirmada noutros membros da linhagem materna da probanda, nomeadamente mãe, tios, tias e avó. Esta é homoplásmica em sete (I-2, II-2, II-3, II-5, II-6, II-7 e II-10) e heteroplásmica em três familiares (II-1, II-8, II-9). Contudo, nenhum destes portadores desenvolveu a doença. O pai (II-4) e avô materno (I-1) fazem também parte da amostragem e não apresentam a referida mutação no mtDNA (figura 10) (Grazina *et al*., 2007).

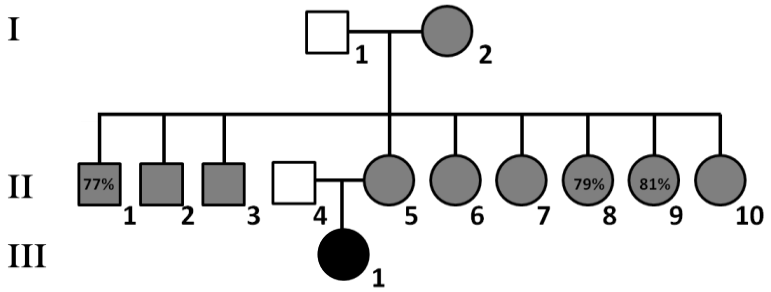

Figura 10. Heredograma referente à família 1.
A cinzento estão identificados os portadores da mutação m.11778G>A que não são doentes. Nos três heteroplásmicos é indicada a percentagem de heteroplasmia. A preto está indicada a probanda do estudo. A branco estão indicados os familiares que não possuem a mutação m.11778G>A.

3.1.2. Controlos

Neste grupo estão incluídas 202 amostras de DNA de indivíduos saudáveis da população portuguesa, sendo 131 do sexo feminino e 71 do sexo masculino, com idades compreendidas entre 5 e 96 anos de idade (média ± desvio padrão: 47 ± 20).

3.1.3. Doentes com LHON

Neste grupo estão incluídos 77 doentes portugueses com suspeita clínica de LHON, sendo 32 do sexo feminino e 45 do sexo masculino, com idades compreendidas entre 1 e 62 anos de idade (média ± desvio padrão: 33 ± 18).

3.2. Análise da sequência dos genes *OPA1* e *OPA3*

3.2.1. Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Uma das grandes descobertas em Biologia Molecular foi a invenção da técnica de PCR, em 1985 por Kary Mullis, valendo-lhe a atribuição de um prémio Nobel. Esta técnica envolve a amplificação rápida de um fragmento de DNA específico de modo a obter numerosas cópias que permitam a realização de ensaios posteriores, tais como a sequenciação de DNA (Mullis *et al*., 1986; Ban, 2006).

Para a PCR é necessária a preparação de uma solução contendo o fragmento de DNA a amplificar, uma DNA polimerase estável ao calor (*Taq* polimerase), quatro tipos de desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs; N=A,T,C,G – bases nitrogenadas adenina, timina, citosina ou guanina, respetivamente) e dois oligonucleótidos designados por *primers*. Estes são compostos por cerca de 20-30 nucleótidos e são complementares às extremidades do fragmento que se pretende amplificar, delimitando deste modo a região de interesse do DNA molde. É ainda necessária a presença de um tampão adequado que forneça as condições ótimas para o funcionamento da enzima. Caso este não inclua magnésio, é necessária a sua adição individualmente pois este é um cofator da *Taq* polimerase e, deste modo, possui um papel importante ao nível da especificidade e rendimento da PCR, atuando como estabilizador da cadeia de DNA (Viljoen *et al*., 2005; Lopes & Souza, 2009).

Após a preparação da *mix* da reação, a amostra é colocada num termociclador onde será submetida a ciclos térmicos que alternam entre temperaturas elevadas e temperaturas mais baixas. A reação é iniciada por uma desnaturação do DNA a uma temperatura elevada, na ordem dos 95°C, desfazendo as pontes de hidrogénio e, consequentemente, separando as duas cadeias complementares. Seguidamente, a uma temperatura inferior (50-60°C), os *primers* ligam-se especificamente às cadeias complementares de DNA em cadeia simples obtidas após a desnaturação. As ligações estáveis

formadas em consequência da hibridização dos *primers* auxiliam a ligação da DNA polimerase que, por sua vez, inicia a extensão. Nesta fase, a temperatura aumenta para 72°C, à qual ocorre a síntese de novas cadeias através da incorporação dos dNTPs à extremidade 3' do *primer* (figura 11). Assim, através de ciclos repetidos de desnaturação, hibridização e síntese, obtém-se uma amplificação exponencial da sequência do DNA de interesse uma vez que em cada ciclo o número de cópias do fragmento a amplificar duplica (Rose, 1991; Markham, 1993; Viljoen *et al*., 2005; Ban, 2006; Lodish *et al*., 2007; Lopes & Souza, 2009).

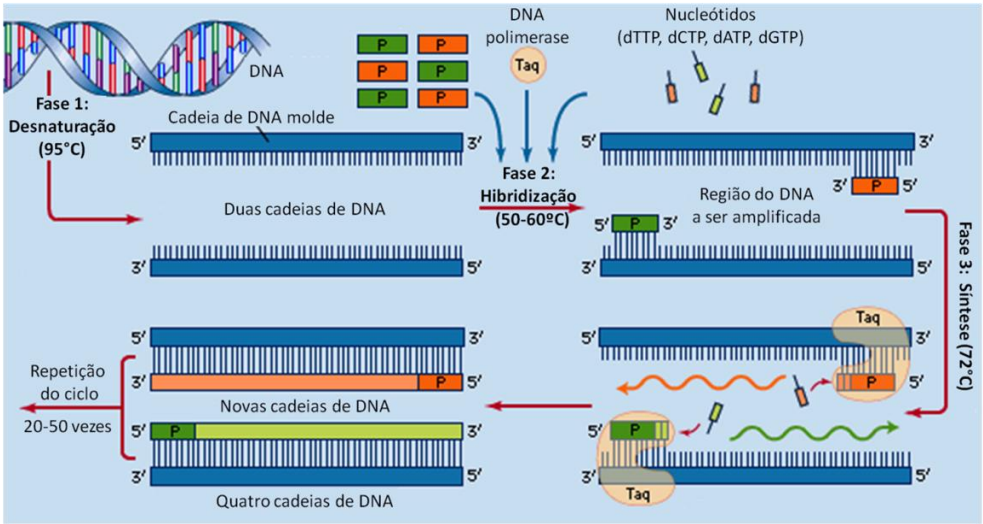

Figura 11. Esquema representativo das fases da PCR (adaptado de Encyclopædia Britannica Online).

No presente trabalho, foram amplificadas por PCR as zonas codificantes (exões) e respetivas regiões adjacentes dos genes *OPA1* e *OPA3*. No caso do gene *OPA1*, utilizaram-se 27 pares de *primers*, cada um referente a um exão do gene e respetivas zonas adjacentes. São exceção três pares que flanqueiam uma zona que engloba mais do que um exão. Para a amplificação do gene OPA3 foram utilizados três pares de primers, cada um referente a um dos exões e zonas adjacentes.

Os primers foram desenhados recorrendo ao programa primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/), partindo da sequência de cada um dos genes obtida em bases de dados (NCBI). A sequência dos primers é essencial para o sucesso da especificidade da PCR, o que implica a necessidade de ter em conta alguns aspetos fundamentais no seu desenho (Viljoen *et al*., 2005). Os *primers* devem conter entre 18 a 30 nucleótidos de tamanho e não devem possuir regiões internas complementares pois estas podem levar à formação de *loops*, que podem impedir a hibridização completa com a sequência de DNA alvo. Regiões complementares entre os dois *primers* do par devem também ser evitadas de modo a impedir a formação de dímeros de *primer*. É necessário ainda ter em conta o conteúdo de Gs e Cs na sequência do *primer* devido à sua influência na estabilidade da ligação com o DNA. Assim, é

geralmente recomendado um conteúdo GC de cerca de 50%. Os *primers* devem hibridizar numa zona do DNA alvo em que estejam ausentes variações de sequência descritas. Os dois *primers* do par devem ser desenhados de modo a que a temperatura de hibridização de cada um não seja significativamente diferente (± 5°C). Os *primers* devem ser complementares apenas à região de interesse e não se ligarem a outras zonas do DNA (Pelt-Verkuil *et al*., 2008).

A PCR realizou-se a partir de uma solução com 10µl de volume contendo DNA (5ng/µl), *primers* (0,2µM), dNTPs (0,2mM), *Taq DNA Polymerase* (GE) (0,5 unidades) e o respetivo tampão (1x). Para confirmar a ausência de contaminação, em cada reação da PCR efetuada incluiu-se um controlo negativo, sem DNA. As reações da PCR foram efetuadas nos termocicladores *Biometra T Gradient*, *Biometra TProfessional Family*, *Verity®* (Applied Biosystems) e *C1000 Touch™* (Bio-Rad).

Cada uma das trinta reações foram inicialmente otimizadas, procedendo à manipulação de parâmetros chave da PCR, nomeadamente o número de ciclos e a temperatura de hibridização dos *primers*, partindo-se inicialmente da temperatura teoricamente prevista. Nos casos em que para além da presença do fragmento pretendido se verificaram amplificações inespecíficas, procedeu-se a um aumento da temperatura de modo a eliminá-las uma vez que estas podem, posteriormente, comprometer os resultados. Nos casos em que a amplificação do fragmento de interesse não foi bem-sucedida (inexistente ou fraca) diminuiu-se a temperatura de hibridização dos *primers* até obter resultados satisfatórios. Outras variáveis que são usualmente manipuladas no processo de otimização da PCR são as concentrações de magnésio, *primers* e DNA (Viljoen *et al*., 2005).

Após a otimização das reações da PCR foi possível estabelecer as temperaturas de hibridização e o número de ciclos adequados a cada ensaio (tabela 4).

Tabela 4. Condições da PCR

Fase	Temperatura	Duração	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	-
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Hibridização	(tabelas 5 e 6)	30 segundos	50
Síntese	72°C	30 segundos	
Extensão final	72°C	10 minutos	-

Nas tabelas 5 e 6 encontra-se a descrição de cada um dos pares de *primers* relativamente à região e ao tamanho do fragmento de DNA que amplificam, com a respetiva temperatura de hibridação.

Tabela 5. Caracterização dos *primers* referentes ao gene *OPA1*.

Exão amplificado*	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Temperatura de hibridização (C°)
1	505	60
2	852	62
3	501	51
4	643	58
4b	454	59
5	492	58
5b	529	60
6	583	60
7	547	60
8	563	56
9	717	59
10 e 11	762	58
12, 13 e 14	1396	60
15 e 16	816	58
17	541	54
18	596	57
19	538	56
20	594	57
21	570	58
22	546	60
23	497	57
24	595	60
25	534	57
26	799	54
27	880	56
28	476	57
29	750	61

Nota: a sequência dos *primers* não poderá ser divulgada até à sua publicação.

Tabela 6. Caracterização dos *primers* referentes ao gene *OPA3*.

Exão amplificado*	Tamanho do fragmento amplificado (pb)	Temperatura de hibridização (C°)
1	633	57
2	842	58
3	805	58

Nota: a sequência dos *primers* não poderá ser divulgada até à sua publicação.

3.2.2. Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos da PCR é crítica na fase de otimização de modo a obter resultados fiáveis e precisos. Para além disso, é também essencial para avaliar as condições para posterior utilização noutras técnicas, como por exemplo, a sequenciação automática ou o RFLP (McPherson & Møller,

2006). Assim, a análise dos produtos da PCR de amplificação permitem determinar a presença ou ausência de amplificações não específicas e a quantidade de um fragmento de DNA alvo amplificada (Pelt-Verkuil *et al*., 2008).

A técnica mais comum e rápida para analisar os produtos da PCR é a eletroforese em gel de agarose (McPherson & Møller, 2006). A agarose na forma de gel providencia a consistência necessária para a separação das moléculas de DNA sujeitas à ação de um campo elétrico, de acordo com o tamanho. Isto é possível devido ao facto do DNA ser carregado negativamente ao pH do tampão utilizado e, consequentemente, migrar em direção ao cátodo (Viljoen *et el*., 2005).

A visualização do DNA é conseguida, frequentemente, através da utilização de brometo de etídio. Este agente químico intercala-se nas cadeias de DNA e emite fluorescência quando excitado a comprimentos de onda situados entre 250 a 310 nm. Assim, é possível a sua deteção através da exposição a radiação UV (Viljoen *et al*., 2005; Pelt-Verkuil *et al*., 2008).

No presente trabalho, utilizaram-se géis de agarose a 1% corados com brometo de etídio (0,1mg/ml) para visualizar os produtos da PCR. Os géis de agarose a 1% proporcionam a resolução suficiente para fragmentos que possuam entre 500 a 4.000 pb (McPherson & Møller, 2006), o que está de acordo com os tamanhos das sequências amplificadas pelos *primers* utilizados, que variam entre 454 e 1.396 pb. Adicionou-se *loading buffer* ao produto da PCR (1:1) antes da sua aplicação no gel. Este reagente possui na sua composição um corante, usualmente o azul de bromofenol, que permite a visualização da amostra durante a eletroforese (Viljoen *et al*., 2005). Para além disso, o *loading buffer* confere densidade, promovendo a fixação da amostra de DNA no poço do gel (Bartlett & Stirling, 2003). Foi utilizado em todos os géis um marcador de peso molecular, o *pUC Mix Marker 8* (Fermentas). No final da eletroforese os géis foram fotografados de modo a serem posteriormente analisados recorrendo ao equipamento *ChemiDoc™ XRS* e respetivo *software* (Bio-Rad).

3.2.3. Purificação dos produtos da PCR

Após a reação de amplificação, permanecem dNTPS e *primers* que não foram incorporados nas novas sequências formadas, sendo necessário eliminá-los, uma vez que podem interferir na reação subsequente. Para este efeito, pode adicionar-se diretamente ao produto da PCR um reagente designado por *ExoSAP-IT®* (Affymetrix), que é constituído por duas enzimas hidrolíticas, a exonuclease I e a fosfatase alcalina (www.affymetrix.com). A primeira remove os *primers* em cadeia única devido à sua atividade de nuclease 3' → 5'. A segunda catalisa a remoção dos grupos 5' fosfato dos dNTPs livres, inativando a sua capacidade de ligação (figura 12) (Dugan *et al*., 2002).

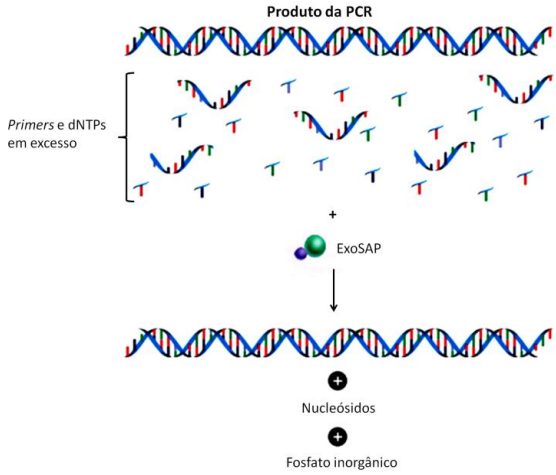

Figura 12. Esquema representativo da purificação dos produtos da PCR pelo reagente ExoSAP-IT® (adaptado de www.affymetrix.com).

Aos produtos da PCR adicionou-se *ExoSAP-IT®* (4:1). Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 37° durante uma hora, sendo esta a ideal para o funcionamento das enzimas. De seguida, procedeu-se à inativação das enzimas a 75°C.

3.2.4. Sequenciação dos fragmentos de DNA

Em 1977, Sanger introduziu uma técnica de sequenciação de DNA, o método didesoxi, cujos princípios serviram de base para o desenvolvimento da sequenciação automática (Sanger *et al*., 1977; Shendure *et al*., 2008). Esta tornou-se a técnica de eleição para determinação de sequências de DNA nas últimas décadas (Strausberg *et al*., 2008).

O método didesoxi baseia-se na síntese, por uma DNA polimerase, da cadeia de DNA complementar à sequência a determinar, utilizando dNTPs e 2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTPs) (Metzker, 2005). Estes são terminadores da síntese devido ao facto de não possuírem o grupo 3'OH presente nos dNTPs e que é essencial para a formação de uma ligação fosfodiéster com o nucleótido seguinte (McPherson & Møller, 2006; Hutchison, 2007). Cada um dos quatro ddNTPs encontra-se marcado com um fluoróforo diferente, o que é essencial para a revelação da sequência, posteriormente, no sequenciador automático (Shendure *et al*., 2008).

Na reação de sequenciação, os dNTPs e ddNTPs estão presentes numa proporção que determina a probabilidade relativa de incorporação de cada um na extensão do *primer*, sendo a concentração de ddNTPs inferior. Para cada molécula de DNA molde, a síntese da cadeia complementar é iniciada a partir da extremidade 3' do *primer* e termina com a incorporação de um ddNTP (Shendure *et al*.,

2008). Consequentemente, geram-se uma série de fragmentos que diferem nas unidades de nucleótidos, existindo nesta população de moléculas cadeias terminadas em cada uma das posições possíveis (Metzker, 2005; McPherson & Møller, 2006).

A reação de sequenciação consiste numa PCR assimétrica (usa-se apenas um *primer*), na qual múltiplos ciclos de desnaturação, hibridização e síntese levam ao aumento linear do número de cadeias "truncadas" (figura 13). Aconselha-se o uso de polimerases termoestáveis que tenham a capacidade de adicionar eficientemente os ddNTPs (Shendure *et al*., 2008). Os parâmetros de cada fase do ciclo da reação de sequenciação diferem significativamente dos da PCR de amplificação de modo a favorecer a incorporação dos ddNTPs (McPherson & Møller, 2006).

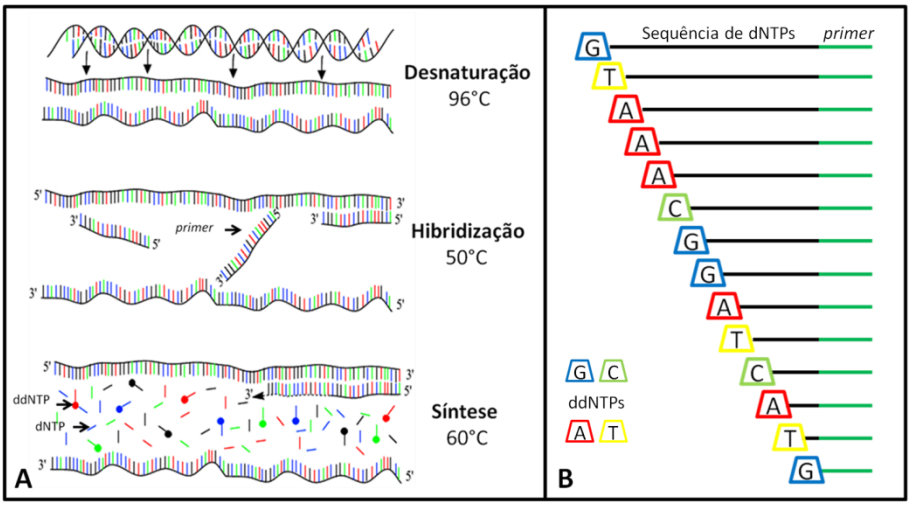

Figura 13. Representação esquemática da reação de sequenciação.
A – Fases da reação de sequenciação; B – Produto da reação de sequenciação: fragmentos de DNA truncados, com diferentes tamanhos, devido à incorporação dos ddNTPS (adaptado de http://users.ugent.be/~avierstr/principles/seq.html).

No presente trabalho utilizou-se um *kit* comercial, *BigDye® Terminator Cycle Sequencing v3.1* (Applied Biosystems), que contém na sua composição os reagentes necessários para a reação de sequenciação, nomeadamente: dNTPs, ddNTPs e DNA polimerase. Foi necessária apenas a adição do DNA previamente purificado e do *primer* específico. Assim, para cada amostra preparou-se uma solução com 10µl de volume, cuja constituição é a seguinte: 2µl de DNA purificado, *primer* (0,32µM), 0,5 µl de *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* e respetivo tampão (0,875x). Esta foi submetida num termociclador a 25 ciclos, cada um com três fases que correspondem às seguintes condições: desnaturação do DNA a 96°C durante 10 minutos, hibridização do *primer* a 50°C durante 5 minutos e quatro minutos de síntese a 60°C (Viljoen *et al*., 2005).

Para a PCR de sequenciação de cada um dos exões e respetivas zonas adjacentes dos genes *OPA1* e *OPA3*, utilizou-se um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) da PCR de amplificação. No entanto, no caso dos fragmentos mais longos, como por exemplo o que inclui os exões 12, 13 e 14 do gene *OPA1* (1396 pb), foram necessárias duas reações de sequenciação, uma com o primer *forward* e outra com o *reverse*, de modo a obter a sequência completa. Procedeu-se também à sequenciação do mesmo fragmento em ambas as direções sempre que houve necessidade de confirmar variações de sequência.

Após a PCR de sequenciação, é necessário que os ddNTPs que permanecem livres sejam removidos, de modo a não interferirem com a etapa subsequente (Tillett & Neilan, 1999). Existem diversos métodos para a remoção dos terminadores não incorporados na reação de sequenciação, incluindo a precipitação por etanol, extração com fenol/clorofórmio e purificação por colunas (Kelley, 1994).

A precipitação por etanol, procedimento utilizado neste trabalho, consiste numa técnica simples, económica e eficiente na remoção de nucleótidos, pequenos oligonucleótidos (<15 nucleótidos) e também ddNTPs (Kieleczawa, 2005; McPherson & Møller, 2006).

Ao produto da reação de sequenciação foram adicionados água e etanol a 95% (5:4:16), centrifugou-se a 2500*xg* durante 30 e adicionaram-se 75µl de etanol a 70% ao sedimento, após o que se centrifugou novamente durante 10 minutos a 2000*xg*. Voltou a descartar-se o sobrenadante e fez-se uma centrifugação a 700*xg* durante um minuto. Por fim adicionaram-se 20µl de *Hi-Di™ Formamida* (Applied Biosystems) (protocolo adaptado de Elles & Mountford, 2004). Este é um agente desnaturante e serve de solvente ao DNA que posteriormente será analisado no sequenciador automático (www.appliedbiosystems.com).

Os produtos da reação de sequenciação purificados são analisados num sequenciador automático por eletroforese capilar com polímero desnaturante, permitindo a separação, com alta resolução, de fragmentos que diferem em apenas um nucleótido (Shendure *et al*., 2008).

Os quatro tipos de ddNTPs utilizados na reação de sequenciação encontram-se marcados com diferentes corantes fluorescentes, cada um deles possuindo o mesmo comprimento de onda de excitação, mas diferentes espectros de emissão. Assim, quando os fragmentos passam pela região de deteção, os fluoróforos ligados aos ddNTPs são excitados, emitindo fluorescência a um dos quatro comprimentos de onda distintos e revelando a identidade do nucleótido terminal. Assim, a ordem dos terminadores fluorescentes de acordo com a separação por tamanho dos fragmentos permite revelar a sequência do DNA (figura 14) (Metzker, 2005; Shendure *et al*., 2008).

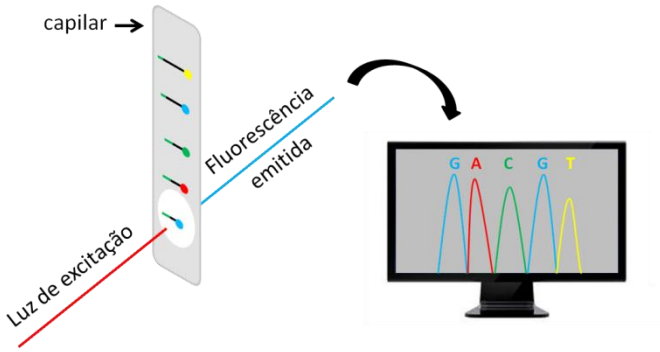

Figura 14. Representação esquemática do processo de sequenciação automática.

No presente trabalho utilizou-se o sequenciador automático *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) e a análise posterior das sequências foi realizada recorrendo aos programas *Sequencing Analysis v5.2* (Applied Biosystems) *SeqScape v2.5* (Applied Biosystems). Este último permite fazer a comparação com a sequência consenso e detetar variações à mesma.

3.3. Análise *in silico*

3.3.1. Análise de patogenicidade

Todas as variações de sequência encontradas nos genes *OPA1* e *OPA3*, que se localizam numa zona codificante e que conduzem à alteração de aminoácido na sequência da proteína, foram analisadas pela ferramenta bioinformática *Polyphen-2®* (Adzhubei *et al*., 2010). Esta permite prever o impacto de uma substituição de aminoácido na estrutura e função de uma proteína. Esta previsão é baseada num conjunto de parâmetros que têm em conta a análise de sequências homólogas, o local específico de ocorrência da substituição e a estrutura tridimensional da proteína (Sanchez *et al*., 2004; Lopes *et al*., 2012).

O *Polyphen-2®* tem em conta oito parâmetros baseados na sequência e três parâmetros baseados na estrutura da proteína. No primeiro grupo, é analisado, por exemplo, o facto da variante estar ou não localizada num local ativo ou de ligação da proteína ou numa outra região funcionalmente importante, como por exemplo uma zona transmembranar. As variáveis estruturais analisadas incluem a verificação da alteração da polaridade, da modificação do *core* hidrofóbico e a influência na interação entre subunidades da própria proteína ou com outras proteínas (Ramensky *et al*., 2002; Jaffe *et al*., 2011).

Para efetuar uma análise no *Polyphen-2®* é apenas necessário inserir o número de identificação da proteína, que pode ser obtido em bases de dados (exemplos: SNPper, UniProt, NCBI), bem como a

posição da alteração na sequência da proteína e a identificação do aminoácido original e do aminoácido resultante da variação genética em estudo. Com base nos diversos parâmetros anteriormente mencionados, o *software* calcula a probabilidade de uma variação de sequência ser patogénica e classifica-a qualitativamente em benigna, possivelmente patogénica ou provavelmente patogénica (Wei *et al*., 2011).

3.3.2. Conservação evolutiva

A probabilidade de uma variação de sequência não sinónima ser causadora de uma doença genética é proporcional ao grau de conservação evolutiva do aminoácido mutado (Vitkup *et al*., 2003). Assim, no presente trabalho avaliou-se a conservação evolutiva dos aminoácidos para os quais se detetaram variações de sequência não sinónimas.

Com este prepósito recorreu-se à base de dados UniProt (UniProt Consortium, 2012) para efetuar o alinhamento das sequências da proteína para as diferentes espécies. Estas foram selecionadas de acordo com outros estudos em que efetuaram este tipo de análise referente à proteína OPA1 (Hudson *et al*., 2008; Man *et al*., 2009b). As espécies consideradas e cuja sequência da proteína em estudo foi comparada com a da espécie humana foram as seguintes: *Pan troglodytes*, *Canis lupus*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Drosophila melanogaster*.

3.3.3. Análise de alteração de *splicing*

Variações de sequência localizadas essencialmente na zona de transição exão-intrão podem conduzir a alterações na junção dos exões ou na remoção dos intrões do pré-mRNA, ou seja, podem interferir com o processo de *splicing*. Assim, as mutações de *splicing* podem ter como consequência a remoção de exões na totalidade ou a utilização de locais de *splicing* alternativos e, consequentemente, originar exões maiores ou menores que os originais (Schaaf *et al*., 2012). Alterações que modifiquem o *donor site* levam geralmente à eliminação do exão enquanto variações de sequência que afetem o *acceptor site* podem conduzir ao prolongamento do exão até ao reconhecimento de um outro local de *splicing*. Em ambos os casos a constituição em aminoácidos da proteína será alterada. Variações de sequência fora da região de transição exão-intrão podem ter consequências semelhantes através da criação de novos locais de *splicing (*Sarkar, 2009).

As variações de sequência encontradas nos genes *OPA1* e *OPA3* que reuniam as seguintes condições foram alvo de um estudo *in silico* para previsão da alteração do processo de *splicing*: i) localização intrónica próxima da região codificante; ii) localização no exão e formação de um possível novo *donor* (GT) ou *acceptor* (AG) *site*.

Com este prepósito recorreu-se à ferramenta bioinformática *NNSPLICE v.0.9®* (Reese *et al*., 1997). O procedimento inclui a realização de duas análises separadamente, sendo uma relativa à sequência consenso e a outra à sequência com a variação em estudo. O resultado de cada uma das análises inclui os *donor* e *acceptor sites* previstos para a sequência inserida, bem como a probabilidade de ocorrência de cada um. Assim, comparando as duas análises efetuadas é possível verificar se uma variação de sequência conduz ao ganho ou perda de possíveis *donor* ou *acceptor sites* ou ainda se leva a uma alteração na probabilidade de ocorrência destes.

3.4. Análise de variações de sequência no gene *OPA1*

3.4.1. PCR-RFLP

A PCR-RFLP é uma técnica muito utilizada para a identificação de variações de sequência genéticas conhecidas. A metodologia envolve o corte de moléculas de DNA em fragmentos mais pequenos, através de enzimas de restrição que reconhecem sequências específicas. Estas enzimas devem reconhecer o local da variação de sequência em estudo, cortando a molécula de DNA apenas na presença de um dos alelos. Assim, conhecendo o tamanho do fragmento amplificado pela PCR e os possíveis locais de corte da enzima no mesmo, é possível prever o número e tamanho de fragmentos que serão gerados consoante o genótipo. A visualização destes é possível através da separação dos produtos digeridos em gel de agarose (Pelt-Verkuil *et al*., 2008; Griffiths *et al*., 2009).

No presente trabalho, foram analisadas por esta técnica três variações de sequência no gene *OPA1* detetadas por sequenciação automática na probanda e familiares. Assim, procedeu-se à genotipagem por PCR-RFLP das amostras do grupo controlo e de doentes com suspeita clínica de LHON, para as alterações *rs7624750*, *rs34307082* e *rs1061648*, localizadas nos exões 4 e 5 e na região 3'UTR do gene *OPA1*, respetivamente.

Inicialmente, procedeu-se à amplificação por PCR das regiões que incluem as variações de sequência a estudar, seguindo-se a eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos de amplificação. Posteriormente, procedeu-se à incubação com a enzima de restrição específica para a deteção de cada uma das variações de sequência. Por cada amostra, utilizou-se 1 unidade de enzima e o tampão respetivo na concentração final de 1x. Estes reagentes foram adicionados ao produto da PCR, sendo o volume final de 15µl. Por fim, incubou-se na estufa a 37°C durante 12 a 16 horas. Terminada a incubação, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 2%. Utilizou-se o marcador de peso molecular *pUC Mix Marker 8 (Fermentas)* para análise dos fragmentos de restrição relativos às variações *rs7624750* e *rs1061648* e o *pUC 19 DNA/MspI (HpaII) Marker 23* (Fermentas) para a alteração *rs34307082*.

Para a análise da variação de sequência *rs7624750* (c.473G>A) utilizou-se a enzima de restrição *FspBI* (Fermentas) cuja sequência reconhecida é a seguinte: 5'…C^TAG…3' (^ = local de corte da enzima). A enzima corta na presença do alelo G, o alelo selvagem. Quando numa amostra está presente o alelo A (5'…CTAA…3') deixa de existir o local de restrição e, consequentemente, a enzima não cliva o DNA. Uma vez que o DNA amplificado possui 643 pb, quando na eletroforese se verificou a presença de um fragmento com este tamanho significa que a amostra possui dois alelos A na posição da alteração em estudo. Por sua vez, quando se identificaram dois fragmentos de 273 e 370 pb, significa que a enzima clivou todas as moléculas de DNA da amostra, revelando um genótipo homozigótico para o alelo G. Por fim, quando estão presentes três fragmentos no produto digerido, de 643, 273 e 370 pb, a amostra é heterozigótica para a variação de sequência em estudo.

Para genotipar a variação de sequência *rs34307082* (c.575C>T), utilizou-se a enzima de restrição *HpyCH4III* (New England Biolabs) cuja sequência de reconhecimento é a seguinte: 5'…ACN^GT…3' (N = qualquer nucleótido). Neste caso, vai ocorrer clivagem do DNA na presença do alelo T, pois na presença do alelo C a sequência no local da alteração (5'…ACGGC…3') não é reconhecida pela enzima. Assim, e uma vez que na sequência de DNA amplificada há apenas um local possível de reconhecimento pela enzima, quando se obtém um fragmento com 492 pb significa que a amostra possui dois alelos C na posição da variação de sequência em análise. Quando no gel de agarose são visualizados dois fragmentos com 238 e 254 pb, a amostra é homozigótica para o alelo T. O genótipo heterozigótico é detetado através da presença de três fragmentos com 492, 238 e 254 pb.

A análise da variação de sequência *rs1061648* (c.*283A>G) foi feita recorrendo à enzima de restrição *HindIII* (Fermentas) que cliva na presença do alelo G. Esta reconhece a sequência 5'…A^AGCTT…3' e, na presença do alelo A (5'…AAACTT…3'), não vai ocorrer clivagem do fragmento. Atendendo ao facto de existir apenas um local de reconhecimento da enzima no fragmento de DNA amplificado, após a digestão enzimática das amostras foram obtidos fragmentos com os seguintes pesos moleculares: 750, 441 e 309 pb. Quando estão os três presentes, significa que a amostra é heterozigótica para a variação de sequência em análise. Nas amostras cujo DNA não foi clivado pela enzima, observando-se um fragmento com 750 pb, significa que estas possuem um genótipo homozigótico para o alelo A. Os casos de homozigotia para o alelo G são identificados pela presença dos fragmentos com 441 e 309 pb.

3.5. Análise estatística

No presente trabalho, foi comparada a distribuição de genótipos e alelos referentes às variações de sequência *rs7624750* e *rs34307082* entre as amostras de indivíduos saudáveis e de doentes com

LHON, recorrendo ao programa *GraphPad Prism 5®*, para realizar os testes Qui-quadrado e exato de Fisher. As diferenças são consideradas significativas quando $p<0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise genética do gene *OPA1*

4.1.1. Sequenciação do gene *OPA1*

Através da sequenciação dos exões e respetivas zonas adjacentes do gene *OPA1* na família 1 (probanda e familiares) identificaram-se 17 variações de sequência. Estas estão descritas na tabela 7, onde consta a localização de cada uma de acordo com as diferentes isoformas do gene. Uma vez que todas as alterações genéticas identificadas já se encontram descritas, estas são identificadas pelo código correspondente (rs). A nomenclatura utilizada para a descrição das variações de sequência está de acordo com as normas da *Human Genome Variation Society* (Dunnen & Antonarakis, 2000 com informação atualizada em http://www.org/mutnomen/). As variações de sequência serão mencionadas posteriormente neste trabalho de acordo com a nomenclatura, ou posição dos aminoácidos na sequência da proteína, relativamente à isoforma de referência, a isoforma 1 (NM_0.15560.2).

Tabela 7. Descrição das variações de sequência identificadas no gene *OPA1* na probanda e familiares.

Variação de sequência	NM_015560.2	NM_130831.2	NM_130832.2	NM_130833.3	NM_130834.2	NM_130835.2	NM_130836.2	NM_130837.2
rs7624750	Exão 4 c.473G>A p.Ser158Asn	Intrão c.448+1432G>A	Intrão c.449-582G>A	Intrão c.448+1432G>A	Exão 4 c.473G>A p.Ser158Asn	Intrão c.449-582G>A	Exão 4 c.473G>A p.Ser158Asn	Exão 4 c.473G>A p.Ser158Asn
rs10937593	Intrão c.556+178G>T	Intrão c.449-1406 G>T	Intrão c.449-321G>T	Intrão c.449-1406 G>T	Intrão c.556+178G>T	Intrão c.449-321G>T	Intrão c.556+178G>T	Intrão c.556+178G>T
rs3772393	Intrão c.557-19T>C	Intrão c.449-19T>C	Intrão c.503-19T>C	Intrão c.449-19T>C	Intrão c.611-19T>C	Intrão c.503-19T>C	Intrão c.557-19T>C	Intrão c.611-19T>C
rs34307082	Exão 5 c.575C>T p.Ala192Val	Exão 5 c.467C>T p.Ala156Val	Exão 5 c.521C>T p.Ala174Val	Exão 5 c.467C>T p.Ala156Val	Exão 5 c.629C>T p.Ala210Val	Exão 5 c.521C>T p.Ala174Val	Exão 5 c.575C>T p.Ala192Val	Exão 5 c.629C>T p.Ala210Val
rs10451941	Intrão c.870+32T>C	Intrão c.762+32T>C	Intrão c.816+32T>C	Intrão c.873+32T>C	Intrão c.924+32T>C	Intrão c.927+32T>C	Intrão c.981+32T>C	Intrão c.1035+32T>C
rs2291373	Intrão c.1444-179G>A	Intrão c.1336-179G>A	Intrão c.1390-179G>A	Intrão c.1447-179G>A	Intrão c.1498-179G>A	Intrão c.1501-179G>A	Intrão c.1555-179G>A	Intrão c.1609-179G>A
rs78767626	Exão 17 c.1608A>C p.Ala536Ala	Exão 17 c.1500A>C p.Ala500Ala	Exão 17 c.1554A>C p.Ala518Ala	Exão 17 c.1611A>C p.Ala537Ala	Exão 17 c.1662A>C p.Ala554Ala	Exão 17 c.1665A>C p.Ala555Ala	Exão 17 c.1719A>C p.Ala573Ala	Exão 17 c.1773A>C p.Ala591Ala
rs113367640	Intrão c.1706-110C>T	Intrão c.1598-110C>T	Intrão c.1652-110C>T	Intrão c.1709-110C>T	Intrão c.1760-110C>T	Intrão c.1763-110C>T	Intrão c.1817-110C>T	Intrão c.1871-110C>T
rs9831900	Intrão c.1770+51T>G	Intrão c.1662+51T>G	Intrão c.1827+51T>G	Intrão c.1773+51T>G	Intrão c.1824+51T>G	Intrão c.1827+51T>G	Intrão c.1881+51T>G	Intrão c.1935+51T>G
rs9851685	Exão 21 c.2109T>C p.Ala703Ala	Exão 21 c.2001T>C p.Ala667Ala	Exão 21 c.2055T>C p.Ala685Ala	Exão 21 c.2112T>C p.Ala704Ala	Exão 21 c.2163T>C p.Ala721Ala	Exão 21 c.2166T>C p.Ala722Ala	Exão 21 c.2220T>C p.Ala740Ala	Exão 21 c.2274T>C p.Ala758Ala
rs10937595	Intrão c.2707+25T>A	Intrão c.2599+25T>A	Intrão c.2653+25T>A	Intrão c.2710+25T>A	Intrão c.2761+25T>A	Intrão c.2764+25T>A	Intrão c.2818+25T>A	Intrão c.2872+25T>A
rs11928971	Intrão c.2707+178C>T	Intrão c.2599+178C>T	Intrão c.2653+178C>T	Intrão c.2710+178C>T	Intrão c.2761+178C>T	Intrão c.2764+178C>T	Intrão c.2818+178C>T	Intrão c.2872+178C>T
rs115528092	Intrão c.2818+119G>A	Intrão c.2710+119G>A	Intrão c.2764+119G>A	Intrão c.2821+119G>A	Intrão c.2872+119G>A	Intrão c.2875+119G>A	Intrão c.2929+119G>A	Intrão c.2983+119G>A
rs114568312	Intrão c.2818+164G>A	Intrão c.2710+164G>A	Intrão c.2764+164G>A	Intrão c.2821+164G>A	Intrão c.2872+164G>A	Intrão c.2875+164G>A	Intrão c.2929+164G>A	Intrão c.2983+164G>A
rs13070791	Intrão c.2818+206C>T	Intrão c.2710+206C>T	Intrão c.2764+206C>T	Intrão c.2821+206C>T	Intrão c.2872+206C>T	Intrão c.2875+206C>T	Intrão c.2929+206C>T	Intrão c.2983+206C>T
rs13070610	Intrão c.2818+207A>G	Intrão c.2710+207A>G	Intrão c.2764+207A>G	Intrão c.2821+207A>G	Intrão c.2872+207A>G	Intrão c.2875+207A>G	Intrão c.2929+207A>G	Intrão c.2983+207A>G
rs1061648	3'UTR c.*283A>G	3'UTR c.*283A>G	3'UTR c.*283A>G	3'UTR c.*283A>G	3'UTR c.*283A>G	3'UTR c.*283A>G	3'UTR c.*283A>G	3'UTR c.*283A>G

Através da análise da tabela 7, verifica-se que 12 das 17 variações de sequência identificadas no gene *OPA1* estão localizadas em zonas intrónicas. Na região codificante, foram encontradas 3 alterações

genéticas, sendo duas delas sinónimas, isto é, não têm como consequência a alteração de aminoácido na sequência da proteína. Uma das variantes genéticas identificadas está presente em quatro das isoformas na região codificante, nomeadamente no exão 4, e nas restantes no intrão, devido ao *splicing* alternativo. Foi também detetada uma variação de sequência localizada na região 3'UTR do gene.

Na tabela 8 é apresentado o genótipo da probanda e familiares deste estudo para cada uma das variações de sequência anteriormente mencionadas.

Tabela 8. Genótipo dos membros da família 1 relativamente às variações de sequência identificadas no gene *OPA1.*

Variação de sequência	III-1	II-1	II-2	II-3	II-4	II-5	II-6	II-7	II-8	II-9	II-10	I-1	I-2
rs7624750	GA	GG	GG	GG	GG	AA	AA	AA	GA	GA	GA	GA	GA
rs10937593	GT	GG	GG	GG	GG	TT	TT	TT	GT	GT	GT	GT	GT
rs3772393	TT	TT	TT	TT	TT	TC	TC	TC	TC	TT	TT	TT	TC
rs34307082	CT	CC	CC	CC	CC	CT	CT	CT	CC	CT	CT	CT	CC
rs10451941	TT	TT	TT	TT	TT	TC	TC	TC	TC	TT	TT	TT	TC
rs2291373	GA	GG	GG	GG	GG	AA	AA	AA	GA	GA	GA	GA	GA
rs78767626	AC	AA	AA	AA	AA	AC	AC	AC	AA	AC	AC	AC	AA
rs113367640	CT	CC	CC	CC	CC	CT	CT	CT	CC	CT	CT	CT	CC
rs9831900	TG	TT	TT	TT	TT	GG	GG	GG	TG	TG	TG	TG	TG
rs9851685	TC	TT	TT	TT	TT	CC	CC	CC	TC	TC	TC	TC	TC
rs10937595	TT	TT	TT	TT	TT	TA	TA	TA	TA	TT	TT	TT	TA
rs11928971	CT	CC	CC	CC	CC	CT	CT	CT	CC	CT	CT	CT	CC
rs115528092	GA	GG	GG	GG	GG	GA	GA	GA	GG	GA	GA	GA	GG
rs114568312	GA	GG	GG	GG	GG	GA	GA	GA	GG	GA	GA	GA	GG
rs13070791	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CT	CT	CT	CC	CC	CC	CT
rs13070610	AG	AA	AA	AA	AA	GG	GG	GG	AG	AG	AG	AG	AG
rs1061648	AG	AA	AA	AA	AA	GG	GG	GG	AG	AG	AG	AG	AG

A verde estão representados os alelos selvagens e a vermelho os mutantes. As variações de sequência herdadas dos indivíduos I-1 e I-2 estão identificadas a azul e rosa, respetivamente. Por sua vez, a verde estão identificadas as alterações genéticas presentes em ambos.

Pode verificar-se, através da tabela 8, que em 4 das 13 amostras não foram identificadas variações de sequência no gene *OPA1*. Estas são, relativamente à probanda, o pai (II-4) e os três tios maternos (II-1, II-2 e II-3). Pode também perceber-se que há alelos que são segregados em associação, verificando-se a existência de três grupos de variações de sequência que se encontram em desequilíbrio de ligação. As variações de sequência referentes a cada um destes grupos estão identificadas com diferentes cores (rosa, azul, verde).

Na figura 15, apresentam-se, a título de exemplo, resultados obtidos na sequenciação automática, representando três eletroferogramas referentes à variação de sequência *rs7624750*. Estes são relativos aos três genótipos possíveis: homozigótico selvagem, heterozigótico e homozigótico mutante.

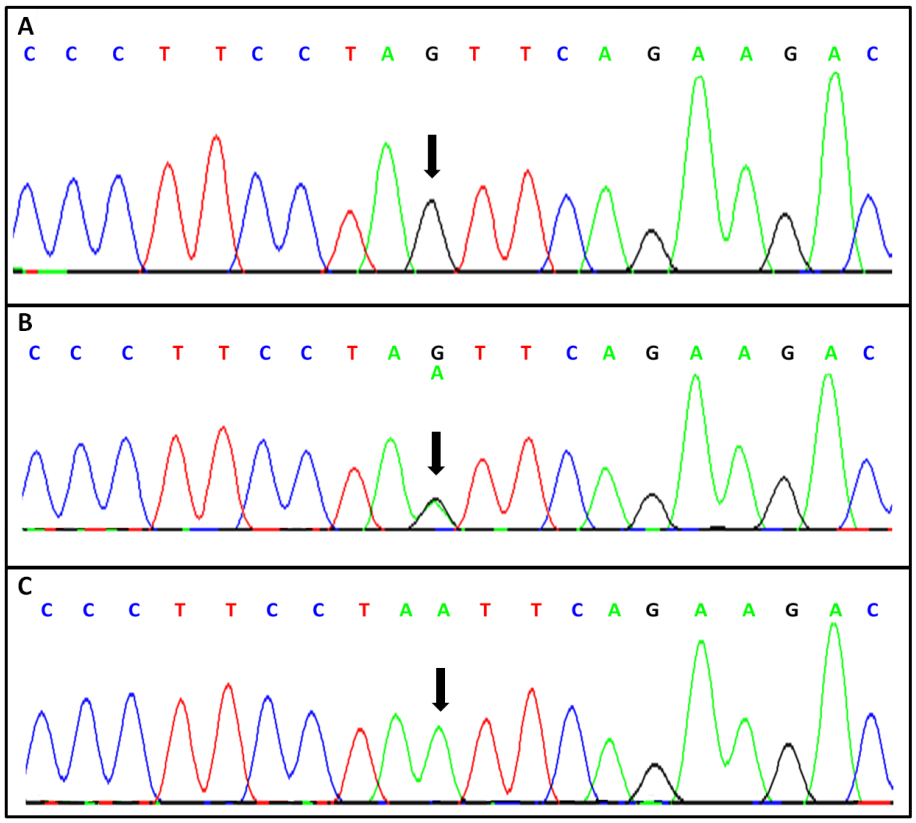

Figura 15. Eletroferogramas referentes à variação de sequência *rs7624750*.
A – II-4 (homozigótico para o alelo G); B – III-1 (heterozigótica); C – II-5 (homozigótica para o alelo A).

Foi criado um heredograma representativo dos genótipos referentes às variações de sequência detetadas em todos os membros da família 1 (figura 16).

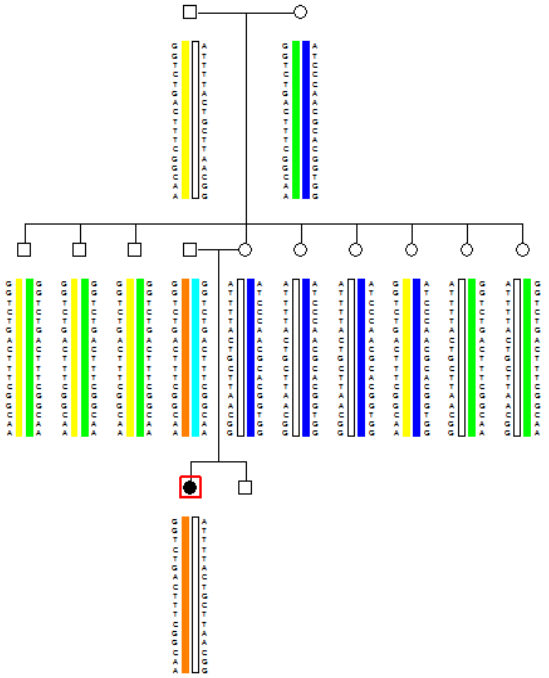

Figura 16. Heredograma representativo dos genótipos de todos os membros da família 1 analisados para as variações de sequência identificadas no gene *OPA1*. As variações de sequência estão representadas pela ordem descrita na tabela 7.

Através da figura 16, verifica-se que os cromossomas representados a amarelo (avô materno da probanda, I-1) e a verde (avó materna da probanda, I-2) são geneticamente iguais para as variações de sequência identificadas, representando os alelos selvagens de cada uma destas. Todos os descendentes masculinos (tios maternos da probanda, II-1, II-2 e II-3) herdaram os cromossomas anteriormente mencionados, possuindo um genótipo selvagem para todas as alterações genéticas. Por sua vez, as descendentes do sexo feminino (mãe e tias maternas da probanda) não possuem todas o mesmo genótipo. Assim, a mãe da probanda (II-5) e duas tias (II-6 e II-7) herdaram ambos os cromossomas com alelos mutantes (cromossoma azul materno e cromossoma branco paterno). Uma das tias (II-8) herdou os alelos mutantes da mãe (cromossoma azul) e os alelos selvagens do pai (cromossoma amarelo), possuindo o mesmo genótipo que a progenitora. As restantes duas tias maternas (II-9 e II-10) herdaram do pai o cromossoma que possui alelos mutantes (cromossoma branco) e da mãe os alelos selvagens (cromossoma verde), possuindo um genótipo igual ao do progenitor masculino e da probanda. Esta herdou do pai os alelos selvagens e, da mãe, o cromossoma com os alelos mutantes provenientes do avô (cromossoma branco).

4.1.2. Análise *in silico*

4.1.2.1. Conservação evolutiva

Foi feito o estudo da conservação evolutiva para as variações de sequência *rs7624750* e *rs34307082*, ambas localizadas em regiões codificantes do gene *OPA1* e que alteram aminoácido na sequência da proteína. As figuras 17 e 18 são referentes ao alinhamento das sequências de nucleótidos do gene e da proteína OPA1 em diferentes espécies, de modo a obter uma representação do processo evolutivo.

A		B
C T T C C T A **G** T T C A G A A	*Homo sapiens*	R K A L P **S** S E D L V
C T T C C T A **A** T T C A G A G	*Pan troglodytes*	R K A L P **N** S E D L V
C T T C C T A **A** T T C A G A A	*Canis lupus*	R K A L P **N** S E D L A
C T G C C C A **G** C T C A G A A	*Mus musculus*	R K A L P **S** S E D L A
C T T C C T G **A** T G C C G A T	*Gallus gallus*	I K A L P **D** A D D L A
T T A C C T G **A** A T T A G A A	*Danio rerio*	A S A L P **E** L E E I A
C T C A T T G **A** G G T G G G C	*Drosophila melanogaster*	S R N L I **E** V G S L V

Figura 17. Conservação evolutiva do nucleótido (A) e do aminoácido (B) referentes à variação de sequência *rs7624750* (assinalados a vermelho).

A		B
G A A A C G G **C** G T T T A G A	*Homo sapiens*	S P E E T **A** F R A T D
G A A A C G G **C** G T T T A G A	*Pan troglodytes*	S P G E T **A** F R A T D
G A A A C A G **C** A T T T A G A	*Canis lupus*	S P G E T **A** F R A T D
G A A A C A G **C** A T T T C G A	*Mus musculus*	S P G E T **A** F R A T D
G A A A C A G **C** A T T C A G A	*Gallus gallus*	T P G E T **A** F R A T D
G A A T C G G **C** C C T A A G A	*Danio rerio*	T T G E S **A** L R A P D
G C G G C C G **A** T T A T C A A	*Drosophila melanogaster*	L D D A A **D** Y Q V A A

Figura 18. Conservação evolutiva do nucleótido (A) e do aminoácido (B) referentes à variação de sequência *rs34307082* (assinalados a vermelho).

Verifica-se que o aminoácido (serina) presente na posição referente à alteração genética *rs7624750* na espécie humana é pouco conservado, encontrando-se apenas na sequência da proteína de uma das espécies estudadas, a *Mus musculus*. Por sua vez, o aminoácido (alanina) que está alterado na variação *rs34307082* possui um grau de conservação evolutiva superior (>85%), estando ausente apenas na sequência da proteína de uma das espécies estudada, a *Drosophila melanogaster*, sendo de todas as que foram analisadas a espécie filogeneticamente menos próxima da espécie humana.

4.1.2.2. Previsão da patogenicidade

Foram analisadas pelo *Polyphen-2®* as mesmas alterações genéticas para as quais se fez o estudo da conservação evolutiva. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Previsão da patogenicidade da variação de sequência *rs7624750* pelo *Polyphen-2®*.

Isoforma do gene *OPA1*	Grau de patogenicidade (0-1)	Classificação
NM_015560.2	0,000	Benigna
NM_130834.2	0,000	Benigna
NM_130836.2	0,001	Benigna
NM_130837.2	0,000	Benigna

Tabela 10. Previsão da patogenicidade da variação de sequência *rs34307082* pelo *Polyphen-2®*.

Isoforma do gene *OPA1*	Grau de patogenicidade (0-1)	Classificação
NM_015560.2	0,804	Possivelmente patogénica
NM_130831.2	0,931	Possivelmente patogénica
NM_130832.2	0,984	Provavelmente patogénica
NM_130833.2	0,994	Provavelmente patogénica
NM_130834.2	0,711	Possivelmente patogénica
NM_130835.2	0,913	Possivelmente patogénica
NM_130836.2	0,879	Possivelmente patogénica
NM_130837.2	0,012	Benigna

Na figura 19, é apresentado, a título de exemplo, um resultado do *Polyphen-2®*, relativo à previsão da patogenicidade para variação de sequência *rs34307082* na isoforma NM_130833.2.

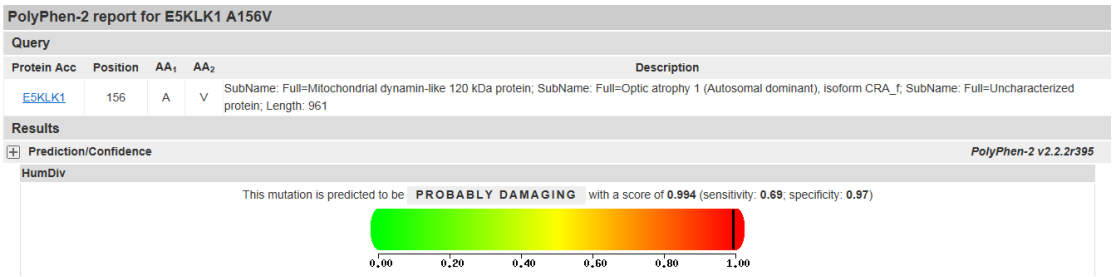

Figura 19. Exemplo de um resultado de previsão da patogenicidade de uma variação genética apresentado pelo *polyphen-2®*. O *score* mais próximo de 1 é indicativo de maior probabilidade de patogenicidade.

4.1.2.3. Previsão da alteração do *splicing*

Foi efetuado o estudo *in silico* de previsão da alteração do *splicing* para as seguintes variações de sequência: *rs3772393*, *rs10451941*, *rs9831900*, *rs10937595* e *rs34307082*. Estas estão localizadas a uma distância máxima da região codificante de 51 pb, exceto a última. Esta está situada na região codificante (exão) e conduz à formação de uma sequência GT, ou seja, de um possível *donor site*.

A título de exemplo da análise dos resultados fornecidos pelo *NNSPLICE v.0.9®*, é apresentada a figura 20, referente à variação *rs3772393*. Verifica-se que não há ganho nem perda de *donor* ou de *acceptor sites* bem como alterações significativas do *score* para cada um dos locais. Uma análise semelhante foi realizada para as restantes variações de sequência, sendo possível concluir que não há evidências de que o processo de *splicing* esteja alterado.

A

Donor site predictions for 193.137.208.131.1199.0 :

Start	End	Score	Exon Intron
337	351	1.00	tagaaagGtaagtgt
362	376	0.60	tgttcatGtaggtag
491	505	0.68	gtacaagGtattacg

Acceptor site predictions for 193.137.208.131.1199.0 :

Start	End	Score	Intron Exon
14	54	0.72	tttttttattgtaattttcAGttatatatttttaattgtta
35	75	0.95	ttatatatttttaattgttAGgttaaacatatgctgcgatt
89	129	0.98	tttttttatttctgcacAGgttatcagtcatgttcctta
255	295	0.93	ggttgcatatttatctttaAGgttctccggaagaaacggcg

B

Donor site predictions for 193.137.208.131.1213.0 :

Start	End	Score	Exon Intron
337	351	1.00	tagaaagGtaagtgt
362	376	0.60	tgttcatGtaggtag
491	505	0.68	gtacaagGtattacg

Acceptor site predictions for 193.137.208.131.1213.0 :

Start	End	Score	Intron Exon
14	54	0.72	tttttttattgtaattttcAGttatatatttttaattgtta
35	75	0.95	ttatatatttttaattgttAGgttaaacatatgctgcgatt
89	129	0.98	tttttttatttctgcacAGgttatcagtcatgttcctta
255	295	0.90	ggctgcatatttatctttaAGgttctccggaagaaacggcg

Figura 20. Resultado obtido pelo *NNSPLICE v.0.9®* para a previsão da alteração do processo de *splicing* pela variação de sequência *rs3772393*. A – *donor* e *acceptor sites* para a sequência com o alelo selvagem (T). B - *donor* e *acceptor sites* para a sequência com o alelo mutante (C).

4.1.3. Análise de variações de sequência no gene *OPA1*

Foram analisadas as duas variações de sequência não sinónimas em termos de codificação de aminoácido, *rs7624750* e *rs34307082*, e a variação de sequência localizada na região 3'UTR do gene *OPA1*, *rs1061648*, em amostras de controlos saudáveis e de doentes com suspeita clínica de LHON. Ambas as amostragens foram rastreadas para a presença da mutação m.11778G>A, verificando-se que esta se encontra ausente nos controlos saudáveis e presente em quatro doentes.

4.1.3.1. Análise da variação de sequência *rs7624750*

Na figura 21, encontra-se representado o exemplo de um resultado da aplicação da técnica de PCR-RFLP, utilizada para a genotipagem da variação de sequência em questão. Pode verificar-se que as

amostras 1 e 2 são heterozigóticas (GA), as amostras 3 e 6 homozigóticas selvagens (GG) e as amostras 4 e 5 homozigóticas mutantes (AA).

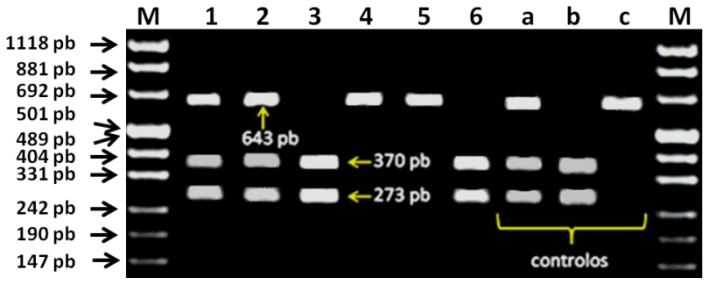

Figura 21. Resultados de PCR-RFLP para a análise da variação de sequência *rs7624750.*
Os números de 1 a 6 são referentes a amostras do grupo de controlos saudáveis. Controlos da técnica: a, b – controlos positivos;
a – heterozigótico; b- homozigótico para o alelo G; c – amostra não sujeita à digestão enzimática. M – Marcador de peso molecular.

Na tabela 11 é apresentada a distribuição de genótipos e alelos referente à variação de sequência em análise na amostragem de controlos saudáveis.

Tabela 11. Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs7624750* em controlos saudáveis.

		Genótipos (n)			Alelos (n)	
Grupo	**n**	**GG**	**GA**	**AA**	**G**	**A**
Controlos	201	61	111	29	233	169
sexo feminino	131	44	64	23	152	110
sexo masculino	70	17	47	6	81	59

Os gráficos apresentados na figura 22 (A e B) são referentes às frequências genotípicas (A) e alélicas (B) da amostragem de controlos saudáveis para a variação de sequência *rs7624750*.

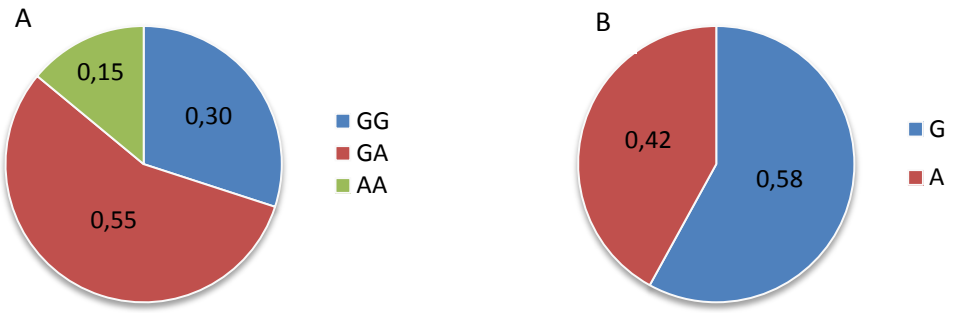

Figura 22. Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs7624750* em amostras de controlos saudáveis.

A mesma variação de sequência foi analisada em 77 doentes com suspeita clínica de LHON. Na tabela 12 é apresentada a distribuição de genótipos e alelos relativamente a esta amostragem.

Tabela 12. Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs7624750* em doentes com suspeita clínica de LHON.

		Genótipos (n)			Alelos (n)	
Grupo	**n**	**GG**	**GA**	**AA**	**G**	**A**
LHON	77	28	36	13	92	62
sexo feminino	32	7	18	7	32	32
sexo masculino	45	21	18	6	60	30

As frequências genotípicas e alélicas referentes a esta amostragem são apresentadas nos gráficos da figura 23 (A e B), respetivamente.

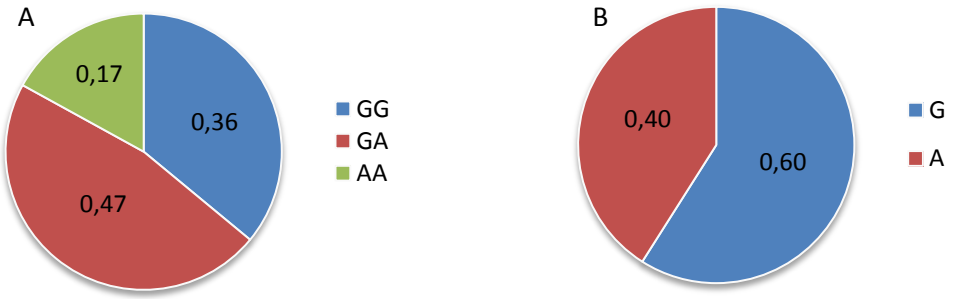

Figura 23. Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs7624750* na amostragem de doentes com suspeita clínica de LHON.

Foram comparadas as distribuições de frequências genotípicas e alélicas entre os controlos saudáveis e os doentes com suspeita clínica de LHON, tendo ainda em conta o género. Os resultados da análise estatística são apresentados na tabela 13. As amostragens encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo por isso consideradas representativas da população em estudo.

Tabela 13. Resultados da análise estatística referentes à comparação da distribuição de genótipos e alelos entre doentes com suspeita clínica de LHON e controlos saudáveis relativamente à variação de sequência *rs7624750*.

Grupo	Valor-*p* genótipos	Valor-*p* alelos
LHON VS controlos	0,4478	0,7731
LHON - sexo feminino VS controlos – sexo feminino	0,4344	0,2629
LHON - sexo masculino VS controlos – sexo masculino	***0,0156****	0,2124

* $p < 0,05$

Verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas para a distribuição dos genótipos nos doentes com LHON do sexo masculino face aos controlos do mesmo sexo, sendo o valor de *p* obtido inferior a 0,05. Para as restantes análises não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

4.1.3.2. Análise da variação de sequência *rs34307082*

Na figura 24 encontra-se representado, a título de exemplo, um dos resultados da análise da variação de sequência *rs34307082* pela aplicação da técnica de PCR-RFLP. Através da observação do padrão de bandas obtido, verifica-se que o genótipo de 6 das amostras (1, 2, 3, 4, 6 e 7) é homozigótico para o alelo selvagem (CC). Por sua vez, a amostra 5 é heterozigótica (CT). Neste estudo não foram identificadas amostras homozigóticas para o alelo T.

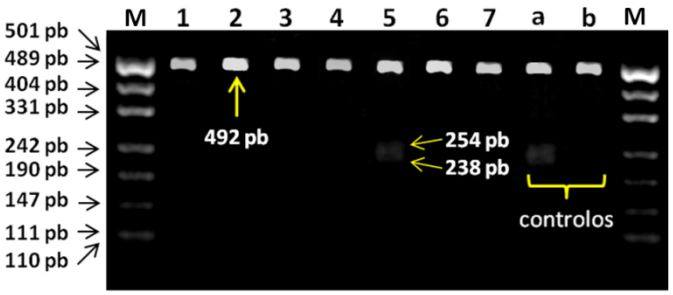

Figura 24. Resultado da técnica de PCR-RFLP para a análise da variação de sequência *rs34307082*.
Os números de 1 a 7 são referentes a amostras do grupo de controlos saudáveis. Controlos da técnica: a – controlo positivo (heterozigótico); b - amostra não sujeita à digestão enzimática.
M – marcador de peso molecular.

Na tabela 14 consta a distribuição genotípica e alélica da amostragem de controlos saudáveis analisada.

Tabela 14. Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs34307082* em controlos saudáveis.

		Genótipos (n)			Alelos (n)	
Grupo	**n**	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**
Controlos	202	195	7	0	397	7
sexo feminino	131	127	4	0	258	4
sexo masculino	71	68	3	0	139	3

As frequências genotípicas e alélicas são apresentadas nos gráficos das figuras 25.

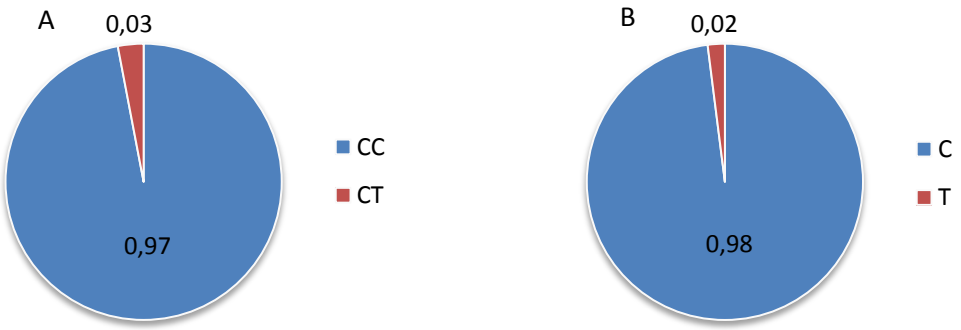

Figura 25. Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs34307082* em amostras de controlos saudáveis.

A distribuição de genótipos para esta variação de sequência nos doentes com suspeita clínica de LHON é apresentada na tabela 15.

Tabela 15. Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs34307082* em doentes com suspeita clínica de LHON.

		Genótipos (n)			Alelos (n)	
Grupo	**n**	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**
LHON	77	74	3	0	151	3
sexo feminino	32	32	0	0	64	0
sexo masculino	45	42	3	0	87	3

Os gráficos apresentados na figura 26 (A e B) são referentes às frequências genotípicas e alélicas da amostragem de doentes com suspeita clínica de LHON.

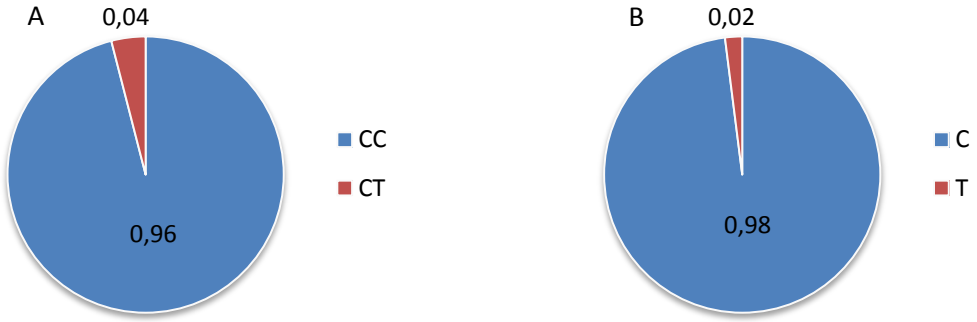

Figura 26. Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs34307082* na amostragem de doentes com suspeita clínica de LHON.

Foi realizada uma análise estatística para verificar se existem diferenças significativas ao nível da distribuição dos genótipos e alelos entre os controlos saudáveis e os doentes com suspeita clínica de LHON, tendo também em conta o género. Os resultados estão indicados na tabela 16. As amostragens encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 16. Resultados da análise estatística referentes à comparação da distribuição de genótipos e alelos entre doentes com suspeita clínica de LHON e controlos saudáveis relativamente à variação de sequência *rs34307082*.

Grupo	Valor-*p* genótipos	Valor-*p* alelos
LHON VS controlos	1,0000	1,0000
LHON - sexo feminino VS controlos – sexo feminino	1,0000	1,0000
LHON - sexo masculino VS controlos – sexo masculino	0,6758	0,6796

Verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas para as análises realizadas, sendo o valor de *p* superior a 0,05 em todos os casos.

4.1.3.3. Análise da variação de sequência *rs1061648*

Na figura 27 encontra-se representado, a título de exemplo, um resultado da análise da variação de sequência *rs1061648* pela aplicação da técnica de PCR-RFLP. Através dos fragmentos obtidos após a digestão enzimática, verifica-se que as amostras 1, 2 e 7 são heterozigóticas, a 3 e a 4 homozigóticas para o alelo A e as restantes (5 e 6) homozigóticas para o alelo G.

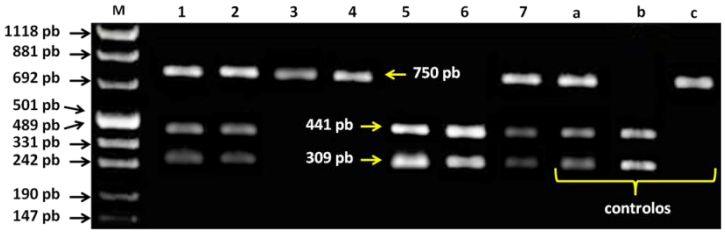

Figura 27. Resultado da técnica de PCR-RFLP para a análise da variação de sequência *rs1061648*.
Os números de 1 a 7 são referentes a amostras do grupo de controlos saudáveis. Controlos da técnica: a e b – controlos positivos (a: heterozigótico; b: homozigótico GG); c - amostra não sujeita à digestão enzimática. M – marcador de peso molecular.

Na tabela 17 é apresentada a distribuição genotípica e alélica da amostragem de controlos saudáveis estudada.

Tabela 17. Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs1061648* em controlos saudáveis.

		Genótipos (n)			Alelos (n)	
Grupo	**n**	**AA**	**AG**	**GG**	**A**	**G**
Controlos	196	37	95	64	169	223
sexo feminino	128	25	59	44	109	147
sexo masculino	68	12	36	20	60	76

As frequências genotípicas e alélicas relativas a esta amostragem são apresentadas nos gráficos da figura 28 (A e B).

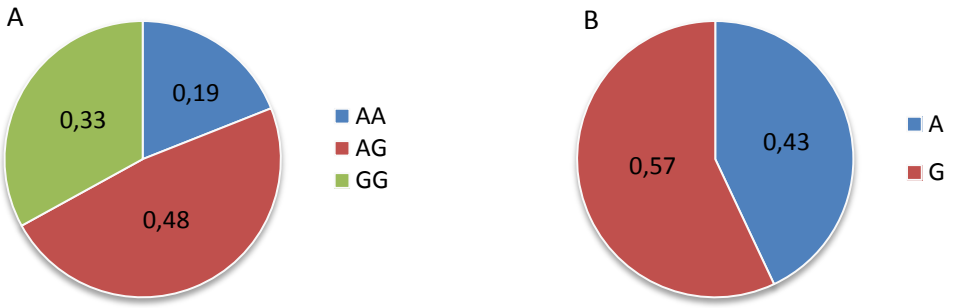

Figura 28. Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs1061648* na amostragem de controlos saudáveis.

A distribuição de genótipos na amostragem de doentes com suspeita clínica de LHON é apresentada na tabela 18.

Tabela 18. Distribuição de genótipos e alelos referentes à variação de sequência *rs1061648* em doentes com suspeita clínica de LHON.

		Genótipos (n)			Alelos (n)	
Grupo	**n**	**AA**	**AG**	**GG**	**A**	**G**
LHON	77	19	36	22	74	80
sexo feminino	32	8	14	10	30	34
sexo masculino	45	11	22	12	44	46

Os gráficos da figura 29 (A e B) são representativos das frequências genotípicas e alélicas da amostragem de doentes com suspeita clínica de LHON.

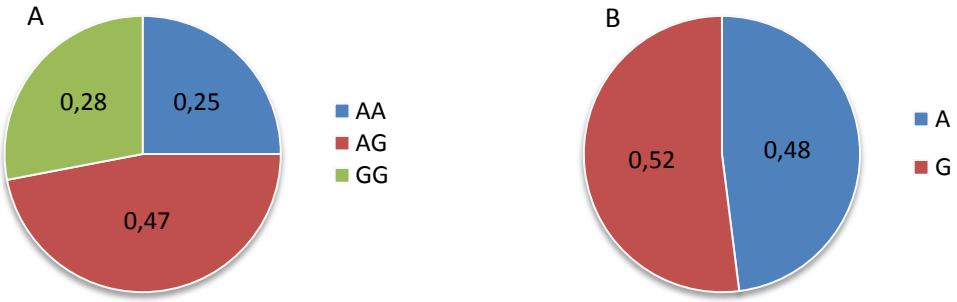

Figura 29. Gráficos representativos das frequências genotípicas (A) e alélicas (B) referentes à variação de sequência *rs1061648* na amostragem de doentes com suspeita clínica de LHON.

À semelhança do que foi efetuado para as duas variações de sequência anteriormente apresentadas, realizou-se uma análise estatística de modo a comparar a distribuição dos genótipos e alelos entre os controlos saudáveis e os doentes com suspeita clínica de LHON. Os resultados estão indicados na tabela 19. Todas as amostragens se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 19. Resultados da análise estatística referentes à comparação da distribuição de genótipos e alelos entre doentes com suspeita clínica de LHON e controlos saudáveis relativamente à variação de sequência *rs1061648*.

Grupo	Valor-*p* genótipos	Valor-*p* alelos
LHON VS controlos	0,5400	0,3387
LHON - sexo feminino VS controlos – sexo feminino	0,7882	0,5741
LHON - sexo masculino VS controlos – sexo masculino	0,6793	0,4983

Verifica-se que não existem diferenças estatisticamente significativas para as análises efetuadas, sendo o valor de *p* superior a 0,05 em todos os casos.

4.2. Análise genética do gene *OPA3*

4.2.1. Sequenciação do gene *OPA3*

Identificaram-se duas variações de sequência nos exões e respetivas regiões adjacentes do gene *OPA3*, das quais uma não se encontra descrita na literatura ou nas bases de dados genéticas disponíveis *online*. A tabela 20 reúne a descrição das duas alterações genéticas, nomeadamente a sua localização no gene em cada uma das duas isoformas.

Tabela 20. Descrição das variações de sequência identificadas no gene *OPA3.*

Variação de sequência	NM_025136.3 (*OPA3A*)	NM_001017989.2 (*OPA3B*)
rs3826860	Exão 2 c.231T>C p.Ala77Ala	Intrão c.143-24367T>C
nova	-	Intrão c.143-23_143-22delCT

A substituição de nucleótido *rs3826860*, identificada no gene *OPA3*, encontra-se localizada em diferentes regiões do gene consoante a isoforma. Em *OPA3B* localiza-se no intrão e em *OPA3A* na região codificante. No entanto, trata-se de uma alteração sinónima uma vez que o aminoácido codificado pelos codões referentes ao alelo selvagem e mutante é o mesmo. A outra variação genética identificada é uma deleção localiza na região intrónica de *OPA3B,* que está ausente em *OPA3A,* uma vez que esta isoforma é constituída por um menor número de nucleótidos e não possui a região onde se localiza a referida variação de sequência.

Na tabela 21, constam os genótipos dos membros da família 1 referentes às duas variações de sequência que foram identificadas no gene *OPA3*.

Tabela 21. Genótipo dos membros da família 1 relativamente às variações de sequência identificadas no gene *OPA3*.

Variação de sequência	III-1	II-1	II-2	II-3	II-4	II-5	II-6	II-7	II-8	II-9	II-10	I-1	I-2
rs3826860	TC	TC	TC	TT	CC	TT	TT	TC	TT	TT	TC	TC	TC
c.143-23_143-22delCT	CT/-	CT/CT	CT/CT	CT/CT	-/-	CT/CT	CT/CT	CT/CT	CT/CT	CT/CT	CT/CT	CT/CT	CT/CT

A verde estão representados os alelos selvagens e a vermelho os mutantes.
No caso da variação de sequência c.143-23_143-22delCT, a deleção dos alelos é representada pelo hifen vermelho (-).

Relativamente à alteração genética *rs3826860*, através da informação que consta na tabela 21, verifica-se que esta está presente em heterozigotia na probanda, à semelhança do que se verifica noutros familiares (I-1, I-2, II-1, II-2, II-4, II-7, II-10). O pai (II-4) é homozigótico para o alelo C, sendo também homozigótico para a deleção intrónica identificada. Esta está presente na probanda (III-1) em heterozigotia.

Na figura 30 estão representados os eletroferogramas referentes à deleção identificada no gene *OPA3*.

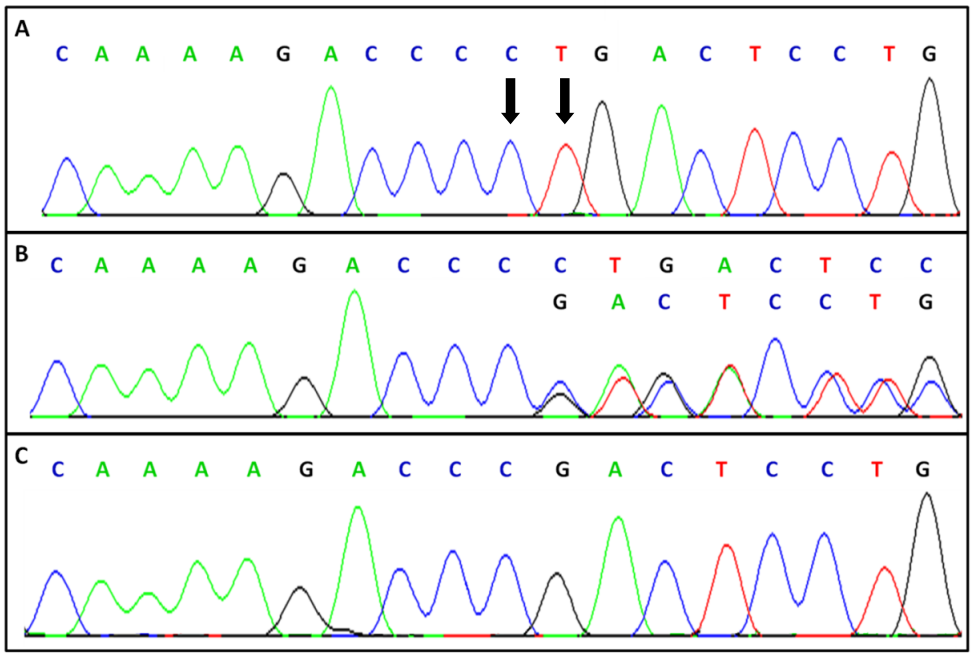

Figura 30. Eletroferogramas relativos à variação de sequência c.143-23_143-22delCT.
A – Amostra homozigótica selvagem (II-5); B – Amostra heterozigótica (III-1); C – Amostra homozigótica para os nucleótidos deletados (II-4).
Os nucleótidos marcados com setas em A são os referentes à deleção.
Quando se verifica a identificação de apenas um nucleótido por posição significa que ambos os alelos daquele *locus* são iguais (homozigotia).

4.2.2. Análise *in silico*

4.2.2.1. Previsão da alteração do *splicing*

Foi realizada uma análise *in silico* para previsão da alteração do processo de *splicing* em consequência da variação de sequência c.143-23_143-22delCT, localizada a 23 pb do início do exão 2 da isoforma *OPA3B*. O resultado é apresentado na figura 31, indicando que a variação genética em análise não causa alteração do processo de *splicing*.

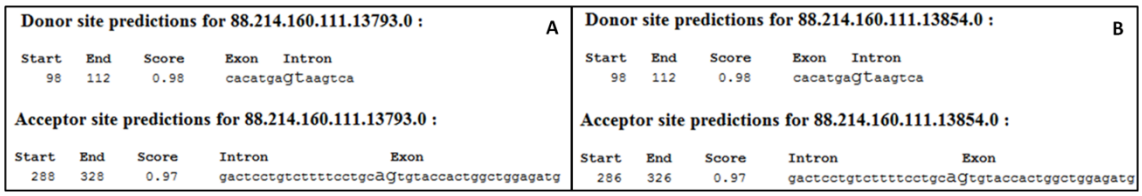

Figura 31. Resultado obtido pelo *NNSPLICE v.0.9®* para a previsão da alteração do *splicing* pela variação de sequência c.143-23_143-22delCT.
A – *donor* e *acceptor sites* para a sequência consenso. B - *donor* e *acceptor sites* para a sequência com a deleção.

5. Discussão

5.1. Análise do gene *OPA1*

Os resultados deste estudo demonstram que, para as regiões do gene *OPA1* analisadas, a doente (III-1) com LHON-*plus* não possui nenhuma variação de sequência que esteja ausente nos familiares da linhagem materna portadores da mesma mutação no mtDNA, a m.11778G>A. Para além disso, o genótipo da probanda, relativamente ao conjunto das variações de sequência no gene *OPA1* que lhe foram detetadas, é igual ao de outros dois familiares (II-9, II-10) que também apresentam a mutação m.11778G>A. É possível concluir que as alterações genéticas identificadas no gene *OPA1* não são a causa primária da manifestação da doença nesta família. Contudo, não pode ser excluída a possibilidade de as variações à sequência consenso, identificadas no gene *OPA1*, estarem relacionadas com o fenótipo atípico e severo de LHON-*plus* da probanda da família-1.

A probanda é portadora de treze das dezassete variações de sequência que foram identificadas no gene *OPA1* na família 1, todas em heterozigotia. Oito destas localizam-se em regiões intrónicas do gene nas oito isoformas, nomeadamente a *rs10937593*, *rs2291373*, *rs113367640*, *rs9831900*, *rs11928971*, *rs115528092*, *rs114568312* e *rs13070610*. Por sua vez, a variação de sequência *rs7624750* encontra-se numa zona intrónica apenas em quatro isoformas de *OPA1* (tabela 7).

A variabilidade fenotípica pode resultar de alterações na expressão dos genes, incluindo diferenças ao nível do processo de *splicing* (Ward & Cooper, 2010). Tem-se verificado que alterações genéticas localizadas nas sequências consenso dos locais de *splicing* (AG e GT) são responsáveis por cerca de 10% das doenças humanas hereditárias. Estas mutações ocorrem geralmente nos nucleótidos das posições +1/+2 ou -1/-2 relativamente ao exão. Assim, uma vez que, no presente trabalho, as nove alterações genéticas identificadas nos intrões do gene *OPA1* se situam a uma distância entre 51 e 1432 pb da região codificante mais próxima, é pouco provável que estas tenham como consequência a alteração de locais de *splicing*. Contudo, já foram identificadas alterações de *splicing* patogénicas localizadas noutras posições, podendo estas estar próximas ou distantes dos dois pares de nucleótidos AG e GT. Deste modo não pode ser excluída a hipótese de este processo se encontrar afetado, tendo sido referido que, cerca de 25% das doenças humanas hereditárias, são devidas a mutações localizadas fora dos locais de *splicing* AG e GT, mas que afetam sequências reguladoras do referido processo (Baralle & Baralle, 2005; Padget, 2012).

Realizámos o estudo *in silico* para previsão da alteração do processo de *splicing* em consequência das variações intrónicas identificadas. Esta análise permitiu inferir que não se prevê que as referidas variações de sequência alterem os *donor* ou *acceptor sites* envolvidos no processo de *splicing*. Contudo, é importante referir que as ferramentas bioinformáticas utilizadas para este tipo de análise possuem limitações no que respeita à distinção entre locais de *splicing* reais ou pseudo-locais

(Baralle & Baralle, 2005). Para além disso, como já foi referido, uma variação de sequência intrónica pode possuir caráter patogénico por outros mecanismos que não apenas a alteração dos *donor* ou *acceptor sites*. Um exemplo disso é a alteração c.870+32T>C (*rs10451941*), localizada no gene *OPA1*, que foi identificada por Mabuchi e colaboradores (2007) como um fator genético associado ao desenvolvimento de glaucoma. Uma vez que esta variação genética foi também identificada neste estudo, embora não esteja presente na probanda (III-1), realizou-se a análise *in silico* para previsão de alteração do *splicing*. Verificou-se que esta provavelmente não tem como consequência a modificação dos *donor* ou *acceptor sites*. Pode daqui concluir-se que esta variação genética, à semelhança do que poderá ocorrer para as restantes alterações intrónicas detetadas neste estudo, a ter consequências funcionais, provavelmente, não serão devidas a alterações nos locais de *splicing* AG e GT.

Os alelos referentes às variações de sequência *rs10937593* e *rs2291373* possuem uma frequência semelhante na população europeia, de acordo com a informação que consta na base de dados NCBI. A alteração genética *rs10937593* foi identificada por Delettre e colaboradores (2001) em doentes com ADOA, não sendo contudo associada à manifestação da doença. Não existem referências na literatura relativamente à variação de sequência *rs2291373*. Porém, esta encontra-se classificada como não patogénica na base de dados *eOPA1* (http://lbbma.univ-angers.fr/eOPA1/) desenvolvida por Ferré e colaboradores (2005).

De acordo com estudos publicados na base de dados NCBI, os alelos mutantes relativos às variações de sequência *rs113367640*, *rs11928971* e *rs115528092*, apresentam-se em baixa frequência (0,025) na população europeia. Contudo, estas variações genéticas não se encontram mencionadas na literatura nem na base de dados *eOPA1*. Relativamente às restantes variações intrónicas identificadas na probanda (III-1), nomeadamente *rs114568312* e *rs13070610*, não existem publicados estudos de frequência nem informação acerca destas na literatura ou na *eOPA1*. A variação de sequência *rs7624750,* quando localizada em regiões não codificantes, encontra-se a uma distância compreendida entre 582 a 1432 pb do exão, consoante a isoforma. Assim, tendo em conta a sua localização distante da região codificante do gene, é mais provável que esta seja relevante nas isoformas em que está presente no exão.

De acordo com a análise das variações de sequência intrónicas identificadas na probanda (III-1) não é possível inferir acerca dos seus efeitos bioquímicos em particular e, consequentemente, da sua possível contribuição para o fenótipo da doente com LHON-*plus*. Embora não existam evidências de que aquelas alterem o processo de *splicing*, o teste definitivo de comprovação advém da análise do RNA do tecido afetado pela patologia, o que, na maioria dos casos, é difícil de obter (Baralle & Baralle, 2005).

Quatro das variações de sequência identificadas na probanda estão localizadas em exões do gene *OPA1* (*rs78767626, rs9851685, rs7624750* e *rs34307082*), o que para uma delas apenas se verifica em quatro isoformas (*rs7624750*), como anteriormente foi referido (tabela 7). Duas destas alterações (rs78767626 e rs9851685) são sinónimas, isto é, não têm como consequência a alteração de aminoácido na sequência da proteína. Contudo, é importante considerar alterações silenciosas como possíveis mediadoras de efeitos patogénicos, estando descrito que 25% das substituições sinónimas, em termos de codificação de aminoácido, podem interferir negativamente com o processo de *splicing* (Cooper *et al*., 2009). De acordo com estes dados, averiguou-se, no presente trabalho, se as alterações de nucleótidos referentes às duas variações de sequência sinónimas identificadas em *OPA1* conduzem à formação de locais de *splicing*, nomeadamente sequências AG e GT no exão, o que não se verificou. No entanto, como já foi referido, não se pode excluir a possibilidade destas alterações genéticas interferirem com o processo de *splicing* através de outros mecanismos.

As variações de sequência silenciosas também podem ter efeitos deletérios ao afetarem a cinética da tradução da proteína e, consequentemente, a sua atividade. Isto porque o tráfego dos ribossomas no mRNA não é uniforme, verificando-se que algumas zonas são traduzidas mais rapidamente que outras. Este processo é modulado pela redundância do código genético, verificando-se que codões sinónimos são traduzidos de forma diferente. Codões mais frequentes, na maioria dos casos, são traduzidos mais rapidamente. Assim, se o codão resultante de uma variação de sequência sinónima alterar a cinética da tradução, é possível que o *folding* da proteína seja modificado (Komar, 2007). Ambas as variações de sequência, *rs78767626* e *rs9851685,* estão associadas à alteração para o codão GCC, o mais frequentemente utilizado para dar origem ao aminoácido alanina. Contudo, o número de tRNAs disponíveis para se ligarem a este, é substancialmente mais reduzido que o verificado para os codões associados aos alelos selvagens respetivos. Assim, é mais provável que a velocidade de tradução esteja diminuída em consequência destas variações de sequência. Isto verifica-se devido a não existir uma correlação absoluta entre a frequência de uso dos codões e a disponibilidade de tRNAs. Na espécie humana existem quatro casos em que o codão mais frequentemente utilizado para codificar determinado aminoácido não possui nenhum gene de tRNA do tipo "Watson-Crick" para o descodificar. Um destes casos é referente ao codão GCC. Nesta situação são utilizados tRNAs alternativos que se ligam por interações diferentes das habituais "Watson-Crick" e, por isso, a velocidade de tradução é diminuída (Spencer & Barral, 2012).

A variação de sequência *rs78767626*, embora já tenha sido identificada em doentes com ADOA, não foi associada ao desenvolvimento da doença (Puomila *et al*., 2005; Yen *et al*., 2010). Um estudo conduzido por Man e colaboradores (2010) permitiu concluir que esta alteração genética também não está associada ao desenvolvimento de uma outra doença oftalmológica, o glaucoma (Man *et al*.,

2010c). Estudos publicados na base de dados NCBI revelam que a frequência do alelo mutante (C) na população europeia é reduzida (0,025). Por sua vez, verifica-se que, para a alteração sinónima *rs9851685,* a frequência dos dois alelos (C e T) na população europeia é idêntica. Toomes, Puomila e colaboradores descreveram esta variação de sequência como benigna, não sendo causadora de um fenótipo de ADOA (Toomes *et a*l., 2001; Puomila *et al*., 2005). Esta já foi também identificada em portadores das mutações patogénicas no mtDNA associadas à LHON, mas não foi possível estabelecer uma associação entre a presença da alteração genética e a manifestação da doença (Hudson *et al*., 2010).

Apesar de nenhuma das variações de sequência sinónimas identificadas na probanda (III-1) do estudo terem sido previamente associadas ao desenvolvimento de LHON ou a outras doenças que envolvem danos nas CGR, não pode ser excluída a possibilidade de estas modificarem aspetos funcionais da proteína OPA1, mesmo que de forma subtil, nomeadamente através de alterações no *folding*. Assim, estas podem manifestar-se fenotipicamente apenas em associação com outras variantes genéticas, que não unicamente a m.11778G>A, que afetem a função mitocondrial e que se acredita estarem presentes na doente referida.

A variação de sequência *rs1061648,* presente na probanda (III-1), com LHON-*plus,* localiza-se na região 3'UTR do gene. Esta situa-se a jusante da sequência codificante da proteína e está associada a diversos processos regulatórios, que incluem a clivagem do transcrito, estabilidade e poliadenilação, tradução e localização do mRNA. É nas regiões 3'UTR dos genes que se localizam as sequências mais conservadas do genoma dos mamíferos. Esta região serve de local de ligação para inúmeras proteínas reguladoras, ou microRNAs. Assim, a região 3'UTR é essencial à correta expressão espacial e temporal de um gene (Barrett *et al*., 2012). A importância desta região genética tem sido salientada pela descoberta de número crescente de polimorfismos e mutações aí localizadas, que alteram a tradução do mRNA e que estão associadas ao desenvolvimento de doenças humanas (Mazumder *et al*., 2003; Wilkie *et al*., 2003). Relativamente à variação de sequência *rs1061648,* não existem estudos publicados na literatura científica, tal como é inexistente, até à data, o conhecimento de mutações patogénicas na região 3'UTR do gene *OPA1*. Contudo, isto pode dever-se ao facto de a maioria dos estudos genéticos não incluírem a análise desta região do gene, focando-se essencialmente nas regiões codificantes.

No presente trabalho foram genotipadas amostras de controlos saudáveis e de doentes com suspeita clínica de LHON, relativamente à variação de sequência identificada na probanda (III-1) que se localiza na região 3'UTR de *OPA1*. Os resultados permitem concluir que ambos os alelos possuem uma distribuição semelhante na amostra da população portuguesa estudada, em concordância com os estudos de frequência publicados na NCBI, referentes à população europeia. Não foram

identificadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição de genótipos e alelos relativamente a controlos e doentes com suspeita clínica de LHON, o que indica que a variação de sequência *rs1061648* não constitui, por si só, um fator de risco para o desenvolvimento de LHON clássica na população portuguesa. Porém, devido às funções da região 3'UTR, não pode ser rejeitada a hipótese de esta variante genética contribuir para o fenótipo *plus* da probanda conjuntamente com outros fatores que permanecem por identificar.

As duas variações de sequência identificadas na doente (III-1) que têm como consequência a alteração de aminoácido na proteína, foram também investigadas com maior detalhe neste estudo, uma vez que este tipo de variantes é de maior interesse, pelo facto de cerca de metade das alterações genéticas responsáveis por doenças humanas serem substituições de aminoácidos (Ng & Henikoff, 2003). Em concordância, verifica-se que as substituições de nucleótidos que conduzem a uma variação de aminoácido constituem grande parte das mutações patogénicas identificadas no gene *OPA1* (Amati-Bonneau *et al*., 2009). A alteração *rs7624750*, como já foi referido anteriormente, localiza-se na região codificante em quatro das oito isoformas do gene devido a estar situada num exão de *splicing* alternativo. Por sua vez, a variação *rs34307082* tem como consequência a alteração de aminoácido nas oito isoformas do gene. Para ambas as variações de sequência não sinónimas, foram analisadas amostras de indivíduos saudáveis da população portuguesa, da qual fazem parte os membros da família 1.

As frequências alélicas e genotípicas referentes à variação de sequência *rs7624750* na população portuguesa são concordantes com as que se encontram publicadas na base de dados NCBI relativas à população europeia. Assim, pode concluir-se que os alelos G e A possuem uma frequência idêntica na população em estudo, evidenciando que esta variação de sequência, por si só, não possui caráter patogénico. Esta conclusão é consistente com o resultado de previsão de patogenicidade obtido pelo *Polyphen-2®* para esta alteração genética. Contudo, é necessário salientar que esta ferramenta bioinformática não tem em conta interações genéticas, analisando apenas a probabilidade de patogenicidade de uma variação de sequência isoladamente. Este é um aspeto crucial no contexto deste estudo uma vez se pretende averiguar se alterações genéticas por si só não patogénicas podem contribuir para a manifestação da doença e para o fenótipo atípico da doente da família 1 com LHON-*plus* (III-1).

A comparação de sequências de espécies evolutivamente próximas e distantes da espécie humana, permite obter uma perspetiva da conservação do aminoácido de uma dada posição ao longo do processo evolutivo. Através desta abordagem, verificou-se que o aminoácido serina, presente na posição da proteína OPA1 referente à variação de sequência *rs7624750,* não se manteve conservado ao longo da evolução (figura 17). Algumas posições da sequência das proteínas variam entre

diferentes espécies, indicando que existem locais onde a alteração de aminoácido pode ser tolerada, não causando um impacto negativo na função (Miller & Kumar, 2001).

Os estudos de associação foram propostos como técnica experimental para identificar a relação entre polimorfismos e fenótipos complexos, nomeadamente doenças humanas multifatoriais (Ramensky *et al*., 2002). Isto porque variações de sequência comuns podem contribuir significativamente para o risco de desenvolvimento de doenças (Lander, 1996). Assim, a variação de sequência *rs7624750* foi analisada num grupo de doentes com suspeita clínica de LHON, para averiguar se constitui um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Através da análise comparativa entre estes doentes e os controlos saudáveis, detetaram-se diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos relativamente ao sexo masculino (p=0,0156). Na amostragem controlo do sexo masculino, 24% das amostras são homozigóticas para o alelo G (GG), 67% heterozigóticas e 9% homozigóticas para o alelo A (AA). Por sua vez, no grupo de homens doentes, com suspeita clínica de LHON, 47% das amostras são homozigóticas para o alelo G, 40% heterozigóticas e 13% homozigóticas para o alelo A. Verifica-se que as maiores diferenças percentuais são referentes aos genótipos GG e GA, estando o primeiro aumentado e o segundo diminuído nos doentes, em relação aos controlos. Assim, a presença do alelo G em homozigotia poderá constituir um fator de risco para o desenvolvimento de LHON, em indivíduos do sexo masculino. O facto de a manifestação desta doença ser consideravelmente superior nos homens indica que existirão fatores, possivelmente genéticos, que contribuem para a penetrância das mutações do mtDNA previamente associadas à LHON. Assim, e uma vez que apenas foi verificada a significância estatística relativamente ao sexo masculino, a variação de sequência *rs7624750* poderá estar relacionada com a manifestação da doença em sinergia com o/os fatores genéticos ainda desconhecidos, que conferem maior predisposição à doença nos homens.

Os alelos G e A, relativos à variação de sequência *rs7624750,* estão associados à presença do aminoácido serina ou asparagina, respetivamente, na posição 158 da proteína OPA1. Ambos os aminoácidos são polares, o que indica que, possivelmente, a sua substituição não terá efeitos demasiado deletérios na função da proteína. Contudo, uma vez que a serina é um aminoácido de pequena dimensão e suscetível de ser fosforilado, é possível que, num contexto estrutural, a sua substituição por um aminoácido maior, como é o caso da asparagina, resulte em diferenças possivelmente significativas na proteína (Betts & Russel, 2003). A variação de sequência em análise localiza-se no exão 4 do gene *OPA1*, o qual não é responsável por codificar nenhum dos principais domínios da proteína, sendo estes os domínios N-terminal, C-terminal, GTPase, GTPase efector e a região dinamina (Amati-Bonneau *et al*., 2009; Landes *et al*., 2010). Contudo, Olichon e colaboradores (2007) demonstraram que este exão é conservado evolutivamente e está funcionalmente

relacionado com a manutenção do potencial de membrana mitocondrial e com a fusão mitocondrial. Assim, foi verificado que o silenciamento das isoformas que contêm o exão 4 afeta a integridade da MIM e a bioenergética mitocondrial, induzindo o processo de fissão. Tal pode ocorrer devido à interação do domínio da OPA1 codificado por este exão com as proteínas Mfn1/MFn2 estar comprometida, afetando o sucesso do processo de fusão. No mesmo estudo, os autores verificaram ainda que os mRNAs que contêm o exão 4 são muito expressos em diversos órgãos humanos (Olichon *et al*., 2007a). Até à data não foram identificadas mutações patogénicas no referido exão.

Tendo em conta a informação anteriormente apresentada, é possível que se verifiquem diferenças ao nível da estrutura da proteína, consoante o aminoácido que se encontra presente na posição 158 da sequência. Deste modo, a ligação do domínio da OPA1 codificado pelo exão 4 às proteínas Mfn1/MFn2 pode ocorrer preferencialmente na presença de um dos aminoácidos. Ambos estão associados a uma localização na superfície das proteínas, onde se prevê que o domínio codificado pelo exão 4 esteja localizado. Contudo, a asparagina está preferencialmente associada a locais de ligação, podendo na presença deste aminoácido a interação com proteínas Mfn1/Mfn2 ser mais eficiente (Betts & Russel, 2003). Consequentemente, na presença do aminoácido serina poderá estar comprometido o sucesso máximo do processo de fusão mitocondrial. Esta hipótese é consistente com o aumento da frequência de genótipos GG, associados à presença do aminoácido serina, em doentes com LHON do sexo masculino comparativamente aos controlos saudáveis. Contudo, é de salientar que os tios da probanda (II-1, II-2, II-3) possuem este mesmo genótipo para a variação genética em questão, bem como uma mutação no mtDNA associada à LHON e, até ao momento, não desenvolveram a doença. Deste modo, é evidenciada a existência de outros fatores genéticos, ainda desconhecidos, associados à manifestação da doença no sexo masculino e que possivelmente estarão ausentes nos tios da probanda. Assim, a variação de sequência *rs7624750* poderá constituir um fator de risco para o desenvolvimento de LHON, em associação com outras variantes genéticas e não apenas com as mutações primárias no mtDNA, nomeadamente a m.11778G>A. Em concordância com os resultados deste estudo, Phasukkijwatana e colaboradores (2010) identificaram uma variação de sequência no gene *OPA1* associada à LHON em doentes do sexo masculino. Esta não foi identificada no presente trabalho e encontra-se localizada numa região diferente do gene, nomeadamente no intrão 29. Assim, o mecanismo pelo qual esta afeta a proteína será diferente do proposto para a alteração no exão 4. Estas evidências sugerem que a alteração da função da proteína OPA1 pode contribuir para a manifestação da LHON no sexo masculino.

A contribuição da variação de sequência *rs7624750* para o desenvolvimento de LHON apenas no sexo masculino pode também estar relacionada com as diferenças existentes, ao nível da produção de ROS e das defesas antioxidantes, entre sexos. As ROS estão associadas a danos celulares, estando o

seu aumento descrito como um dos mecanismos envolvidos na patogénese da LHON. Sabe-se atualmente que a produção de ROS está aumentada no sexo masculino. Em concordância, foi demonstrado que as enzimas antioxidantes possuem maior expressão e atividade nas mulheres (Borrás *et al*., 2003). Deste modo, as mitocôndrias, no género masculino, estão significativamente mais sujeitas a danos oxidativos do que as do sexo feminino (Borrás *et al*., 2007). Um estudo realizado por Rodríguez-Cuenca e colaboradores (2002) apresentou evidências de que existem diferenças entre géneros também relativamente a parâmetros morfométricos mitocondriais. Assim, as mitocôndrias das mulheres exibem uma área e perímetro superiores bem como uma maior densidade de cristas, fatores associados a uma maior atividade. Tendo isto em conta, nos homens, alterações subtis na função de proteínas que desempenhem um papel ao nível da mitocôndria, como é o caso da OPA1, podem ser menos toleradas.

A variação genética *rs7624750* já foi identificada em diversos estudos em doentes com LHON, ADOA, glaucoma e neuromielite ótica, não tendo sido verificada segregação com nenhuma das quatro doenças. Contudo, a análise feita pelos autores não incluiu a divisão por sexo, o que não permite uma comparação direta com os resultados obtidos no presente estudo (Delettre *et al*., 2001; Puomila *et al*., 2005; Yao *et al*., 2006; Nakamura *et al*., 2006; Hudson *et al*., 2010; Phasukkijwatana *et al*., 2010; Sitarz *et al*., 2012b; Yen *et al*., 2010).

Relativamente à variação de sequência *rs7624750,* os nosso resultados sugerem, que esta, por si só, ou apenas em associação com a m.11778G>A, não possui caráter patogénico, uma vez que foi identificada em homozigotia com a mutação no mtDNA em indivíduos saudáveis. Assim, verifica-se que o aminoácido presente na posição da proteína referente a esta variação de sequência é pouco conservado. Contudo, a variação de sequência pode constituir um fator de risco para a manifestação da LHON no sexo masculino e, eventualmente, contribuir para o fenótipo atípico da probanda através da interação com outras variantes genéticas, não identificadas neste estudo, que estarão presentes nesta e ausentes nos restantes familiares portadores da mutação m.11778G>A.

A identificação deste possível fator de risco em *OPA1* evidencia o facto de a LHON ser uma doença complexa, na qual podem estar envolvidas diversas variantes genéticas, podendo estas estar localizadas em diferentes genes, e diferirem de acordo com o sexo. Destaca-se ainda o facto de os alelos referentes à variação de sequência em questão estarem em desequilíbrio de ligação, sendo este um fator indicativo de que a relação com a doença no sexo masculino pode dever-se ao efeito bioquímico derivado do haplótipo, e não apenas da *rs7624750*, ou ainda a qualquer uma das restantes variações de sequência associadas. O desequilíbrio de ligação entre alelos comuns, como é o caso, pode ser particularmente relevante na identificação de genes de predisposição para doenças (Reich *et al*., 2001). O desequilíbrio de ligação verifica-se quando um alelo particular de um *locus* é

encontrado em associação com outro alelo de um segundo *locus,* mais frequentemente do que seria de esperar se o *loci* fosse segregado independentemente na população (Ardlie *et al*., 2002).

Através da análise de controlos saudáveis, representativos da população portuguesa, para a variação de sequência *rs34307082*, obtiveram-se resultados concordantes com os publicados na base de dados NCBI e na literatura, nomeadamente num estudo realizado por Stewart e colaboradores, relativamente à população europeia (Stewart *et al*., 2008). Verificou-se que o alelo C possui uma frequência elevada (0,98) na população portuguesa, estando o alelo T presente em 2% dos indivíduos. Os alelos que possuem uma baixa frequência, essencialmente os que estão relacionados com variações genéticas associadas a uma alteração de aminoácido, representam uma forte indicação de que a variante é prejudicial. Estas baixas frequências refletem a seleção sobre os alelos mutantes durante a evolução humana (Cargill *et al*., 1999). A presença do alelo selvagem, o alelo C, traduz-se na codificação do aminoácido alanina, que se encontra conservado entre diferentes espécies (figura 18). Alterações de aminoácido associadas ao desenvolvimento de doença ocorrem frequentemente em resíduos conservados, evidenciando a importância desses locais para a função normal da proteína (Miller & Kumar, 2001).

A análise bioinformática usando o *Polyphen-2®* classifica esta variação de sequência como benigna, quando presente numa das isoformas, possivelmente patogénica em cinco e provavelmente patogénica em duas das oito isoformas do gene *OPA1*. A isoforma para a qual o *Polyphen-2®* prevê que a variação seja benigna, a NM_130837.2, possui os três exões alternativos do gene (4, 4b e 5b), que se encontram localizados na vizinhança do exão onde se localiza a alteração (exão 5). Segundo Olichon e colaboradores (2007), os domínios codificados pelos exões 4b e 5b, estão relacionados com a regulação do processo apoptótico. Assim, tendo em conta a localização do exão 5, é possível que este esteja também relacionado com a função apoptótica, através do sequestro do citocromo c nas cristas mitocondriais, tal como se verifica para os domínios codificados pelos exões 4b e 5b. Uma vez que os exões 4, 4b e 5b são exões alternativos, é possível que alterações no domínio codificado pelo exão 5 sejam menos graves, sob o ponto de vista funcional na isoforma em que os três estão presentes. Neste caso, a função apoptótica poderá estar assegurada pela presença dos exões 4b e 5b e a proteína poderá, na presença dos três exões alternativos, possuir uma determinada estrutura tridimensional mais favorável à sua funcionalidade. Contudo, de acordo com estudos realizados em células HeLa, esta isoforma não é a que apresenta níveis mais elevados de expressão. Os níveis de expressão mais elevados são relativos às isoformas NM_015560 e NM_130836, para as quais o *Polyphen-2®* prevê que a variação de sequência em análise seja possivelmente patogénica (Olichon *et al*., 2007a).

Os alelos C e T, referentes à variação de sequência *rs34307082*, têm como consequência a codificação do aminoácido alanina e valina, respetivamente, na posição 192 da sequência da proteína OPA1. Ambos são aminoácidos hidrofóbicos e pertencem ao grupo dos alifáticos. A alanina e a valina raramente estão envolvidas diretamente na função da proteína, desempenhando o seu papel essencialmente ao nível do reconhecimento de substratos. Estes constituem particularmente ligandos hidrofóbicos, tais como lípidos (Betts & Russel, 2003). Esta informação é consistente com o domínio da proteína codificado pelo exão 5, uma vez que não se trata de um dos domínios principais na função da OPA1 (Amati-Bonneau *et al*., 2009). A presença, neste domínio, de aminoácidos com alta afinidade para ligandos hidrofóbicos pode estar relacionada com a ligação da proteína aos fosfolípidos da MIM, necessária para a formação de junções que mantêm o citocromo c no interior das cristas mitocondriais (Frezza *et al*., 2006; DiMauro & Schon, 2008).

No domínio das oito isoformas do gene *OPA1* codificado pelo exão 5, encontra-se localizado um local de clivagem para proteases que, em conjunto com outro local de clivagem na região codificada pelo exão 5b, é responsável pela formação das isoformas curtas da proteína. Estas são necessárias, em conjunto com as isoformas longas, para assegurar o processo de fusão mitocondrial (Song *et al*., 2007). Assim, o aminoácido da posição onde ocorre a alteração não sinónima identificada no exão 5, a alanina, pode ser necessário para a ligação da protease que reconhece o local de clivagem. Apesar do aminoácido resultante da presença do alelo mutante, a valina, possuir características semelhantes ao aminoácido alanina, a substituição de um pelo outro pode ser lesiva. De facto, a alanina é um aminoácido de dimensões reduzidas e a sua substituição por um de dimensões consideravelmente superiores, como é o caso da valina, pode levar a alterações relevantes ao nível da estrutura da proteína (Betts & Russel, 2003). Já foram identificadas mutações patogénicas no gene *OPA1* resultantes da substituição do aminoácido alanina pelo aminoácido valina (Man *et al*., 2010b). Tendo isto em conta, é possível que a variação de sequência *rs34307082* conduza à alteração do processo de fusão mitocondrial e/ou do processo de apoptose. Contudo, até à data não foram identificadas mutações patogénicas no exão 5 do gene *OPA1*.

De acordo com a análise estatística efetuada para comparar a distribuição de genótipos e alelos entre doentes com suspeita clínica de LHON e controlos saudáveis, não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos. Porém, neste estudo não foram identificadas amostras homozigóticas para o alelo T. Deste modo, pode concluir-se que a variação de sequência em heterozigotia, por si só, não será patogénica e não constitui um fator de risco para o desenvolvimento de LHON clássica, ou seja, apenas com o envolvimento de danos visuais. Contudo, atendendo à previsão de patogenicidade de acordo com o *Polyphen-2®*, à baixa frequência do alelo mutante na população portuguesa e à conservação evolutiva do aminoácido correspondente, esta

variação de sequência poderá, possivelmente de acordo com os mecanismos anteriormente propostos, constituir um dos fatores genéticos envolvidos no fenótipo LHON-*plus* da probanda.

À semelhança do que se verificou para outras variações de sequência analisadas neste estudo, a *rs34307082* já tinha sido identificada em doentes com LHON e com ADOA, embora não fosse descrita como fator causal do desenvolvimento de nenhuma das duas doenças (Puomila *et al*., 2005; Hudson *et al*., 2010). Para além disso, Stewart e colaboradores (2008) detetaram também esta alteração genética em doentes com múltiplas deleções no mtDNA, embora não verificassem diferenças na sua frequência entre controlos e doentes. Contudo, e à semelhança do que se verificou no nosso estudo, não foram identificados homozigóticos para o alelo mutante.

Através da análise dos genótipos dos membros da família 1 para cada uma das variações de sequência identificadas no gene *OPA1* é possível verificar que determinados alelos são herdados em conjunto, ou seja, ocorre desequilíbrio de ligação. Assim, verifica-se a presença de três grupos de variações de sequência cujos alelos se encontram em desequilíbrio de ligação entre si (tabela 22).

Tabela 22. Variações de sequência no gene *OPA1* identificadas nos membros da família 1 que se encontram em desequilíbrio de ligação.

Grupo	Variações de sequência
1	*rs7624750, rs10937593, rs2291373, rs9831900, rs9851685, rs13070610, rs1061648*
2	*rs34307082, rs78767626, rs113367640, rs11928971, rs115528092, rs114568312*
3	*rs3772393, rs10451941, rs10937595, rs13070791*

As frequências alélicas referentes à população europeia publicadas na base de dados NCBI apoiam a hipótese de desequilíbrio de ligação entre os alelos de quatro das variações de sequência incluídas no grupo 1 (tabela 22), nomeadamente a *rs7624750*, *rs10937593*, *rs9831900* e *rs9851685*. Por sua vez, as frequências alélicas relativas às variações *rs2291373* e *rs1061648* são discordantes. Não é possível tirar conclusões acerca da alteração genética *rs13070610,* uma vez que não se encontra informação disponível publicada na base de dados NCBI. Num estudo publicado por Stewart e colaboradores, também referente à população europeia, foi analisada a sequência dos exões de *OPA1*, verificando-se igualmente que os alelos das variações de sequência *rs7624750* e *rs9851685* estão em desequilíbrio de ligação (Stewart *et al*., 2008). Assim, as únicas alterações para as quais os estudos anteriormente mencionados não são consistentes com a associação entre alelos verificada na família 1 são as *rs2291373* e *rs1061648*. Tal pode dever-se à ocorrência de recombinações ou aos aspetos demográficos das populações, uma vez que estes fatores afetam a distribuição dos alelos em desequilíbrio (Ardlie *et al*., 2002). Contudo, em relação à variação de sequência *rs1061648*, a análise

efetuada nos controlos saudáveis e doentes com LHON neste estudo permitiu concluir que na população portuguesa os alelos desta variante genética não se encontram em desequilíbrio de ligação com os da *rs7624750*, tal como parece verificar-se na família em estudo.

Relativamente às variações de sequência do grupo 2 (tabela 22), as frequências alélicas publicadas na base de dados NCBI, referentes à população europeia, 0,025 para o alelo mutante e 0,075 para o selvagem, são concordantes com a hipótese de desequilíbrio de ligação. O mesmo estudo de Stewart e colaboradores anteriormente mencionado, também permite confirmar que os alelos das variações localizadas na região codificante, nomeadamente a *rs34307082* e *rs78767626*, são herdados em associação (Stewart *et al*., 2008).

As frequências alélicas publicadas na base de dados NCBI, referentes à população europeia, são indicadoras de que os alelos das variantes genéticas *rs3772393* e *rs10451941*, pertencentes ao grupo 3 (tabela 22), se encontram em desequilíbrio de ligação. Verifica-se que o alelo menos comum está presente em 40% e o mais comum em 60% da população do respetivo estudo. Por sua vez, os resultados de Stewart e colaboradores apoiam a hipótese de ligação dos alelos referentes a estas duas variações de sequência e também à *rs10937595* (Stewart *et al*., 2008). Relativamente à *rs13070791,* não se encontram publicadas as frequências em bases de dados ou na literatura.

As quatro variações de sequência do grupo 3 (tabela 22) não se encontram presentes na probanda, mas apenas em familiares da linhagem materna. Estas alterações encontram-se localizadas no intrão, a distâncias da região codificante mais próxima que variam entre 19 e 206 pb. Assim, foi efetuado o estudo *in silico* para previsão da alteração do processo de *splicing*. Os resultados são indicadores de que este não se encontra afetado em consequência destas alterações.

As variações de sequência *rs3772393* e *rs10937595* foram identificadas em doentes com ADOA por Delettre, Yen e colaboradores mas não foram associadas à manifestação da doença (Delettre *et al*., 2001; Yen *et al*., 2010). Destas, apenas a primeira foi identificada também em doentes com LHON, não se verificando a sua segregação com a doença (Hudson *et al*., 2010). Isto está de acordo com os resultados do presente estudo, uma vez que portadores da mutação m.11778G>A e da referida variação de sequência não são doentes. De acordo com os dados publicados na literatura, a variação de sequência *rs10451941* não está associada a LHON, ADOA ou neuromielite ótica (Delettre *et al*., 2001; Puomila *et al*., 2005; Nakamura *et al*., 2006; Hudson *et al*., 2010; Man *et al*., 2010a; Yen *et al*., 2010; Sitarz *et al*., 2012b). Contudo, a sua associação ao desenvolvimento de glaucoma é ainda alvo de controvérsia, uma vez que este polimorfismo intrónico foi associado ao desenvolvimento de glaucoma de tensão normal apenas em alguns dos estudos efetuados, nomeadamente nas populações japonesa e inglesa (Mabuchi *et al*., 2007; Man *et al*., 2010c). Contudo, resultados de

análises que incluiram também doentes japoneses, não mostraram associação da variação de sequência *rs10451941* ao desenvolvimento da doença (Sato *et al*., 2003; Woo *et al*., 2004; Kumaramanickavel *et al*., 2005; Yao *et al*., 2006; Liu *et al*., 2007; Wolf *et al*., 2009). Assim, é possível que esta constitua um fator de risco para o desenvolvimento de glaucoma, apenas em algumas populações. Relativamente à alteração *rs13070791,* não existem dados publicados na literatura científica disponível. No presente estudo, as variações de sequência do grupo 3 (tabela 22) foram identificadas em indivíduos saudáveis e portadores da mutação m.117785G>A, indicando que a sua interação com esta alteração não resulta num fenótipo patológico, na família 1.

Verifica-se que a probanda apresenta os dois haplótipos correspondentes às variações de sequência do grupo 1 e 2 (tabela 22) em heterozigotia, podendo estes estar relacionados com o fenótipo atípico e severo de LHON que esta apresenta. De acordo com as funções da proteína OPA1, estas variações de sequência podem, possivelmente, interferir com processos cruciais tais como a apoptose, estrutura das cristas, fusão mitocondrial, manutenção do mtDNA e OXPHOS. Nenhuma das alterações genéticas possui caráter patogénico por si só, podendo no entanto manifestar-se em alterações ténues na função da proteína, que, na ausência de outras anomalias, não se manifestam ao nível do fenótipo. Contudo, na presença de outros processos mitocondriais afetados, devido a outros fatores genéticos, é possível que estas variações de sequência contribuam para a disfunção mitocondrial e, consequentemente, para um fenótipo da doença mais grave. Neste caso, as variantes identificadas na probanda podem agravar os efeitos da mutação m.11778G>A, em simultâneo com outros fatores genéticos determinantes para o desencadear da doença que se acredita estarem presentes mas que não foram identificados neste estudo. Assim, a contribuição para o fenótipo da doente pode dever-se à interação de ligeiras alterações nos processos dependentes da proteína OPA1, anteriormente mencionados, com as anomalias características da LHON, tais como a diminuição da produção de energia, aumento da produção de ROS, diminuição das defesas antioxidantes, aumento da sensibilidade das células à apoptose e alteração do transporte axonal das mitocôndrias.

Mutações no gene *OPA1* já foram identificadas em fenótipos *plus* envolvendo uma sintomatologia clínica semelhante à apresentada pela doente III-1 da família 1, nomeadamente atrofia ótica, oftalmoplegia e ataxia. Contudo, estes doentes apresentavam também deleções múltiplas no mtDNA, evidenciando a importância do gene *OPA1* na sua manutenção da estrutura e integridade. Os autores do estudo sugeriram que a OPA1 pode fazer parte do nucleóide e, consequentemente, alterações nesta proteína podem levar à disrupção desta estrutura e potenciar a formação de mutações no mtDNA, bem como a sua expansão clonal. Os neurónios e o músculo-esquelético são particularmente vulneráveis à acumulação destas mutações somáticas, o que explica o fenótipo

clínico desenvolvido (Hudson *et al*., 2008). Foram também identificadas por outros autores mutações no gene *OPA1* como estando na causa de fenótipos *plus* através de um mecanismo que envolve, igualmente, instabilidade e múltiplas deleções no mtDNA. Os autores apresentam duas hipóteses para explicar a relação entre a disfunção da OPA1 e a desestabilização do nucleoide. Assim, esta poderá ser devida à ação indireta de alterações na morfologia das cristas mitocondriais ou à interação direta do domínio N-terminal da OPA1 com o mtDNA (Amati-Bonneau *et al*., 2008). As duas variações de sequência não-sinónimas, identificadas em *OPA1*, estão localizadas em exões adjacentes aos que codificam para o domínio N-terminal e poderão, de acordo com o que foi anteriormente mencionado, afetar o processo de fusão mitocondrial e, consequentemente, a morfologia das cristas. Assim, em consequência, poderá verificar-se alguma instabilidade levando a alteração no mtDNA. Estas por sua vez, poderão estar relacionadas com a "penetrância" da mutação m.11778G>A, presente na probanda e familiares.

Neste estudo, verificou-se que os tios da probanda (II-1, II-2 e II-3), portadores da mutação m.11778G>A do sexo masculino, não herdaram dos seus progenitores nenhum dos alelos mutantes referentes às variações de sequência identificadas no gene *OPA1*. Embora este resultado se encontre de acordo com as regras da hereditariedade mendeliana, é possível que haja uma relação com fatores genéticos inerentes aos cromossomas sexuais. Sugerimos a hipótese de que pode estar presente no único cromossoma X dos tios da probanda um fator genético que seja incompatível com a vida, em conjunto com os alelos mutantes das variações de sequência no gene *OPA1*. Nesta caso, nas mulheres estará presente um outro cromossoma X sem a hipotética alteração que permita que a interação entre as variantes não seja letal. Uma outra hipótese pode estar relacionada com alterações no cromossoma Y incompatíveis com as variações de sequência no gene *OPA1* e com a mutação no mtDNA. Poderá ainda verificar-se que as alterações no gene *OPA1*, identificadas neste estudo, sejam incompatíveis com a vida em portadores da mutação m.11778G>A do sexo masculino. Em qualquer uma das hipóteses apresentadas, é evidenciado que as variações de sequência identificadas neste estudo em *OPA1*, ou alguma em particular, não serão neutras para a função da proteína.

Apesar de nenhuma das variações de sequência identificadas na probanda ser responsável pela manifestação da doença na família, não pode excluir-se o envolvimento de alterações genéticas em *OPA1*, dado que, no presente trabalho, não foi analisada a sequência total do gene, nomeadamente regiões cruciais à sua função, tais como o promotor e as regiões 5' e 3'UTR, tendo sido esta última apenas sequenciada parcialmente e cuja relevância foi discutida. Por sua vez, o promotor é uma região regulatória do DNA localizada a montante do gene, à qual se liga o fator de transcrição IID e permite a subsequente coordenação dos componentes do complexo de iniciação da transcrição,

facilitando o recrutamento da RNA polimerase II e a iniciação da transcrição. A região 5'UTR é também uma região reguladora que se localiza na extremidade 5' de todos os genes e que possui vários fatores regulatórios, desempenhando um papel essencial no controlo da iniciação da tradução (Barrett *et al*., 2012). Variações de sequência nas regiões referidas poderão afetar a expressão do gene ou a sua tradução para proteína.

O gene *OPA1* poderá estar envolvido na penetrância incompleta das mutações no mtDNA associadas à LHON, não apenas devido a fatores inerentes à sequência genética, mas também a modificações epigenéticas. A epigenética refere-se ao estudo das alterações na expressão dos genes que ocorrem independentemente da sequência de DNA. Assim, defeitos ao nível dos mecanismos epigenéticos, tais como a metilação do DNA e a modificação das histonas, já foram associados ao desenvolvimento de diversas doenças por causarem uma expressão inapropriada ou conduzirem ao silenciamento dos genes (Egger *et al*., 2004; Rodenhiser & Mann, 2006). Contudo, pode ainda verificar-se uma expressão normal do gene e uma tradução eficaz, mas a proteína estar sujeita a modificações pós-tradução ineficientes. As modificações pós-tradução constituem uma série de eventos que alteram as propriedades de uma proteína através de mecanismos de clivagem ou da adição de grupos modificadores a um ou mais aminoácidos. Modificações pós-tradução de uma proteína podem determinar a sua atividade, localização e interação com outras proteínas (Mann & Jensen, 2003).

5.2. Análise do gene *OPA3*

A sequenciação das regiões codificantes e respetivas zonas adjacentes do gene *OPA3* permitiu a identificação de duas variações genéticas relativas à sequência consenso (tabela 20). Uma destas encontra-se já descrita, a *rs3826860*, e está localizada na isoforma *OPA3A,* numa região codificante, sendo contudo sinónima, no que respeita ao aminoácido resultante. Na isoforma *OPA3B,* esta variação de sequência está numa região intrónica a uma distância de 24.367 pb do exão mais próximo. A segunda variação genética é uma deleção intrónica, apenas presente em *OPA3B* uma vez que esta isoforma é mais longa, estando a sequência onde se verifica a alteração ausente em *OPA3A*.

A alteração genética *rs3826860*, tratando-se de uma variação de sequência sinónima, poderá, eventualmente, manifestar-se ao nível funcional através da alteração da cinética da tradução, tal como foi explicado na secção referente à análise do gene *OPA1*. A variação de sequência é referente à alteração de T para C, o que se traduz na substituição de um codão GCT para GCC, ambos codificantes do aminoácido alanina. Assim, esta situação é semelhante à verificada para as variações de sequência sinónimas identificadas no gene *OPA1* (*rs78767626* e *rs9851685*), prevendo-se que a velocidade de tradução do aminoácido possa estar diminuída na presença do codão GCC.

Consequentemente, podem surgir alterações no *folding* da proteína, tal como foi anteriormente referido (Komar, 2007; Spencer & Barral, 2012).

As frequências alélicas referentes à variação *rs3826860*, publicadas na base de dados NCBI, revelam uma frequência do alelo selvagem de 0,65 e do alelo mutante de 0,35 na população europeia. Este polimorfismo foi detetado num estudo efetuado por Eiberg e colaboradores (2006), no qual não verificaram a sua segregação com a doença em estudo, a ADOA. Outros autores chegaram à mesma conclusão, que resultou de um estudo efetuado em doentes com diagnóstico de atrofia ótica, nos quais foi estudada a sequência de *OPA3* (Man *et al*., 2011b). Contudo, um estudo referente à análise do gene *OPA3* em doentes com anomalias neurológicas e acidúria 3-metilglutacónica, identificou esta variação de sequência em cerca de 92% dos doentes. Com o objetivo de estudar o seu impacto na função da proteína, Neas e colaboradores (2005) efetuaram um estudo de previsão da alteração do processo de *splicing*. Para tal recorreram à mesma ferramenta bioinformática utilizada no presente trabalho, concluindo que, em consequência da variação genética, não se prevê a criação ou perda de *donor* ou *acceptor sites*. Contudo, foi ainda realizada, pelos autores do referido estudo, uma análise *in silico* relativa às sequências ESE (*exon splicing enhancers*). Estas são comuns nos exões e atuam como locais de ligação para as proteínas SR, ricas em serina e arginina. Estas constituem uma família de fatores conservados que participam em várias etapas do processo de *splicing*, possuindo cada um deles substratos específicos. No estudo em questão verificou-se que a variação de sequência sinónima resulta num aumento do *score* para uma sequência ESE de ligação à proteína SF2 SR, sugerindo uma possível alteração no processo de *splicing*. Contudo, a análise do mRNA dos fibroblastos não demonstrou a presença de isoformas alternativas, sugerindo que, possivelmente, esta variação de sequência não será patogénica (Cartegni *et al*., 2002; Neas *et al*., 2005).

A variação de sequência *rs3826860* está presente em heterozigotia na probanda e noutros familiares portadores da mutação m.11778G>A, o que exclui o facto de se tratar de uma causa genética responsável pela manifestação da doença. A alteração está presente em homozigotia no pai da probanda, o que, em associação com a frequência de cada um dos alelos na população analisada e com os dados publicados na literatura, revela que esta variação de sequência não é patogénica por si só. Contudo, à semelhança do que foi discutido relativamente ao gene *OPA1,* esta variação de sequência poderá contribuir para a disfunção mitocondrial, agravando o fenótipo clínico da doente, através dos mecanismos anteriormente mencionados. Porém, tendo em conta o escasso conhecimento científico atual acerca do gene e da proteína OPA3, é prematuro formular uma hipótese para o seu possível envolvimento na manifestação da doença.

A outra variação de sequência identificada no gene *OPA3* é uma deleção intrónica, localizada a uma distância de 22 pb do exão 2 de *OPA3B*. A análise *in silico* indica que, relativamente à sequência

consenso, esta alteração não modifica o processo de *splicing* através da perda ou ganho de *donor* ou *acceptor sites*. Porém, os efeitos deletérios devidos a variações de sequência nos intrões podem dever-se, não apenas a alterações no processo de *splicing,* mas também ao nível da expressão do gene, uma vez que podem existir nos intrões *enhancers* do processo de transcrição ou promotores alternativos (Barrett *et al*., 2012).

Segundo Huizing e colaboradores (2010), a isoforma onde se localiza a deleção possui baixos níveis de expressão e é pouco conservada, indicando que a proteína resultante não será vital para os humanos. Até à data não foi identificada, até à data, nenhuma mutação patogénica nesta isoforma. A deleção intrónica está presente no pai da probanda em homozigotia o que evidencia que esta não possui caráter patogénico primário.

Esta variação de sequência é a única identificada neste estudo que está presente na probanda e ausente nos restantes portadores da mutação m.11778G>A. Contudo, atendendo ao resultado da análise *in silico* de previsão de alteração do *splicing* efetuada e ao que se pensa ser o diminuto contributo de *OPA3B* para a função das células humanas, não é evidente que esta variação de sequência se manifeste ao nível funcional ao ponto de ser o fator genético determinante para a manifestação da doença nos portadores da mutação m.11778G>A da família 1.

A análise da sequência do gene *OPA3* efetuada neste trabalho não permitiu a identificação de um fator genético responsável pela penetrância incompleta associada à mutação m.11778G>A presente na família em estudo. Contudo, seria importante analisar pormenorizadamente a deleção intrónica identificada em *OPA3B,* de modo a clarificar os seus possíveis efeitos, nomeadamente em sinergia com a mutação m.11778G>A, uma vez que se trata do único fator genético identificado neste estudo exclusivo da probanda relativamente aos restantes portadores da mutação no mtDNA.

A eventual contribuição das variações de sequência identificadas no gene *OPA3* para o fenótipo clínico da probanda pode dever-se a alterações no processo de fissão mitocondrial, apoptose ou manutenção da CRM (Wortmann *et al*., 2012). As possíveis alterações na função da proteína OPA3, caso se verifiquem, serão ténues, não possuindo, por si só, capacidade de causar doença. Contudo, podem contribuir para a disfunção mitocondrial, em sinergia com outras variantes genéticas. Por outro lado, não pode excluir-se a influência da OPA3 na manifestação da doença, uma vez que não foi analisada toda a sequência genética, nomeadamente regiões reguladoras, como foi referido anteriormente na análise dos resultados referentes ao gene *OPA1*. Do mesmo modo, não pode ser rejeitada a hipótese do envolvimento da proteína OPA3, nomeadamente por mecanismos epigenéticos.

Mutações no gene *OPA3*, mais precisamente na isoforma *OPA3A*, são causadoras da síndrome de Costeff, cujos sintomas clínicos são semelhantes aos que a doente com LHON-*plus* deste estudo apresenta, nomeadamente atrofia ótica, hipotonia, ataxia, disfunção extrapiramidal e declínio cognitivo (Sitarz *et al*., 2012a). Estas semelhanças apoiam a hipótese de que a OPA3 possa estar envolvida na manifestação do fenótipo clínico da doente deste estudo, embora possivelmente devido a fatores que não foram alvo de análise neste estudo.

É importante salientar que a penetrância das mutações associadas à LHON pode dever-se, não apenas a fatores genéticos, mas também a influências ambientais ou anatómicas dos portadores, nomeadamente relativas à fisionomia do nervo ótico. A conformação anatómica da cabeça do nervo ótico apresenta elevada variabilidade na população em geral, no que diz respeito à área e à forma. Num estudo realizado em 2009, investigou-se a associação entre a anatomia da cabeça do nervo ótico e a manifestação clínica da LHON, concluindo que o seu tamanho poderá constituir um fator importante para determinar se indivíduos portadores de uma determinada mutação irão desenvolver a doença. Os resultados revelaram que o tamanho da cabeça do nervo ótico é superior em indivíduos portadores, comparativamente a indivíduos doentes, e também que doentes com disco ótico maior demonstraram uma evolução da doença mais favorável, incluindo ao nível da recuperação visual (Ramos *et al*., 2009).

5.3. Perspetivas futuras

As causas genéticas de suscetibilidade a doenças complexas podem refletir um espectro diferente, relativamente a variações de sequência que causam doenças genéticas simples, nomeadamente mutações *missense* e *nonsense*. Polimorfismos que afetem a expressão de genes podem ser relevantes. Deste modo, e atendendo ao que já foi referido acerca da importância das regiões reguladoras dos genes, nomeadamente promotor, 3'UTR e 5'UTR, seria relevante proceder à sequenciação destas regiões nos genes *OPA1* e *OPA3* na família 1 em estudo. É importante ter em conta que as variantes localizadas em regiões reguladoras não podem ser avaliadas através do seu contexto na sequência genética, sendo necessárias outras análises laboratoriais funcionais. No caso da avaliação de variações de sequência localizadas na região promotora, os ensaios são laboriosos e complexos, razão pela qual esta região permanece pouco estudada na maioria dos genes. Contudo, existem evidências na literatura que apoiam a importância de estudar esta região, nomeadamente um estudo conduzido por Hoogendoorn e colaboradores (2003) no qual foram analisados os promotores de 170 genes, verificando-se que, aproximadamente um terço das variantes genéticas identificadas, podem modificar a expressão do gene em 50% ou mais.

Consoante os resultados da sequenciação das regiões reguladoras anteriormente mencionadas, nomeadamente no caso de serem detetadas variações à sequência consenso, seria lógico analisar os transcritos do gene através da técnica de PCR em tempo real (Wong & Medrano, 2005). Os níveis da proteína poderiam ser investigados por *Western blot*, a técnica convencional para este tipo de análise (Dale *et al*., 2012). Esta abordagem experimental poderá também ser útil para avaliar a possibilidade de alterações epigenéticas estarem na base de variações na expressão do gene e/ou nos níveis de proteína. Deste modo, seria possível clarificar o envolvimento dos genes *OPA1* e *OPA3* e respetivas proteínas na manifestação da doença na família em estudo. Sem estes dados não é possível excluir a hipótese de as proteínas OPA1 e OPA3 estarem envolvidas no desenvolvimento de LHON-*plus*, em particular na família 1.

Atendendo ao objetivo deste estudo, nomeadamente de encontrar variações de sequência genéticas que explicassem a penetrância incompleta das mutações no mtDNA associadas à LHON, seria importante analisar amostras de portadores das referidas mutações, afetados e não afetados pela doença. Deste modo, poderiam ser efetuados estudos de associação semelhantes aos realizados por Hudson e colaboradores (2010), que foram apresentados na publicação referente à análise do gene *OPA1* na LHON.

Uma das limitações do presente estudo diz respeito ao facto de ser analisada a sequência dos genes *OPA1* e OPA3 apenas numa doente com fenótipo *plus*. A inclusão de outros doentes com LHON-*plus* possibilitaria averiguar se as variações de sequência detetadas neste estudo estão associadas e contribuem para o desenvolvimento deste tipo de fenótipo mais grave, mas trata-se de uma doença muito rara.

O facto de, na família 1, os membros do sexo masculino portadores da mutação m.11778G>A não serem portadores dos alelos mutantes referentes às variantes genéticas identificadas no gene *OPA1,* tendo ainda em conta as hipóteses relacionadas com os cromossomas sexuais anteriormente mencionadas, seria relevante analisar os cromossomas X e Y nesta família.

O prosseguimento deste estudo passaria também pela análise da sequência dos genes nucleares *SLC7A14*, *MFN1*, *MRPL47*, *MCCC1* e *PARL*, localizados no cromossoma 3 (3q26.2-3q28) à semelhança de *OPA1*. Estes foram selecionados por Phasukkijwatana e colaboradores (2010) como prováveis genes nucleares envolvidos na penetrância incompleta associada à LHON.

A sequenciação completa do mtDNA nos membros da família 1, seria um contributo importante para o estudo, uma vez que está descrito na literatura científica que variações de sequência neste genoma contribuem para a manifestação da LHON em portadores das mutações no mtDNA (Pello *et al*., 2008; Gómez-Durán *et al*., 2012; Shu *et al*., 2012). Para além disso, Melberg e colaboradores (2009)

descreveram um doente portador da mutação m.11778G>A e de uma deleção no mtDNA que manifestou LHON e PEO, à semelhança da doente deste estudo.

Atendendo ao facto de no presente trabalho se terem identificado diferenças estatisticamente significativas entre controlos saudáveis e doentes, do sexo masculino, com suspeita clínica de LHON, relativamente à distribuição de genótipos referentes à variação de sequência *rs7624750*, seria relevante a realização de estudos funcionais. Tendo em conta a hipótese anteriormente apresentada, seria importante avaliar o processo de fusão mitocondrial na presença de ambos os aminoácidos inerentes à variação genética em questão. Deste modo, poderiam ser analisados parâmetros indicadores do estado do processo de fusão, tais como a morfologia e a fragmentação mitocondrial (Chen *et al*., 2005). Uma outra hipótese seria a realização de microscopia confocal *time-lapse* para avaliar a dinâmica mitocondrial (Chen *et al*., 2003).

6. Conclusões

Os resultados deste estudo permitem concluir que variações de sequência nos exões dos genes *OPA1* e *OPA3* e respetivas zonas adjacentes, provavelmente, não são responsáveis pela manifestação de LHON em portadores da m.11778G>A. Contudo, não se pode excluir que as proteínas OPA1 e OPA3 estejam envolvidas na penetrância da mutação no mtDNA por outros mecanismos.

Os nossos dados permitem sugerir que as variações de sequência identificadas na probanda (III-1 da família 1) podem contribuir para o fenótipo, uma vez que se trata de um caso atípico e grave de LHON-*plus*, para o qual, possivelmente, contribuirão múltiplos fatores. Entre estes podem constar ligeiras alterações funcionais nas proteínas OPA1 e OPA3, em consequência de polimorfismos que, por si só, ou apenas em associação com a m.11778G>A, não resultam em doença. Contudo, estes podem contribuir para a disfunção mitocondrial característica da LHON, em associação com fatores presentes exclusivamente na probanda relativamente aos restantes portadores da mutação no mtDNA que permanecem ainda por identificar.

O presente estudo permitiu a identificação de um possível fator de risco genético associado ao desenvolvimento de LHON, em indivíduos do sexo masculino, nomeadamente o genótipo GG referente a uma variação de sequência não sinónima localizada no exão 4 de *OPA1* (p. Ser158Asn).

Tanto quanto é do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo dos genes *OPA1* e *OPA3* realizado em Portugal, tratando-se de um contributo relevante para o estudo genético da LHON.

7. Referências Bibliográficas

Abu-Amero K, Jaber M, Hellani A & Bosley T (2010). Genome-wide expression profile of LHON patients with the 11778 mutation. The British Journal of Ophthalmology. 94:256-259.

Adzhubei I, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky V, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov A & Sunyaev S (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*. 7:248-249.

Amati-Bonneau P, Odent S, Derrien C, Pasquier L, Malthiéry Y, Reynier P & Bonneau D (2003). The association of autosomal dominant optic atrophy and moderate deafness may be due to the R445H mutation in the OPA1 gene. *American Journal of Ophthalmology*. 136:1170-1171.

Amati-Bonneau P, Guichet A, Olichon A, Chevrollier A, Viala F, Miot S, Ayuso C, Odent S, Arrouet C, Verny C, Calmels MN, Simard G, Belenguer P, Wang J, Puel JL, Hamel C, Malthièry Y, Bonneau D, Lenaers G & Reynier P (2005). OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Annals of Neurology*. 58:958-963.

Amati-Bonneau P, Valentino M, Reynier P, Gallardo M, Bornstein B, Boissière A, Campos Y, Rivera H, Aleja J, Carroccia R, Iommarini L, Labauge P, Figarella-Branger D, Marcorelles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liguori R, Morgia C, Montagna P, Liguori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martín M, Arenas J, Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D, Carelli V (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain*. 131:338-351.

Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D, Chevrollier A, Ferré M, Guillet V, Guequen N, Loiseau D, Crescenzo M, Verny C, Procaccio V, Lenaers G & Reynier P (2009). OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41:1855-1865.

Amutha B, Gordon D, Gu Y & Pain D (2004). A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance. *The Biochemical Journal*. 381:19-23.

Anderson S, Bankier A, Barrell B, Bruijn M, Coulson A, Drouin J, Eperon I, Nierlich D, Roe B, Sanger F, Schreier P, Smith A, Staden R & Young I (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290:457-465.

Anikster Y, Kleta R, Shaag A**,** Gahl W & Elpeleg O (2001). Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or costeff optic atrophy syndrome): identification of the OPA3 Gene and its Founder mutation in Iraqi Jews. *The American Journal of Human Genetics*. 69:1218-1224.

Andrews R, Kubacka I, Chinnery P, Lightowlers R, Turnbull D & Howell N (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*. 23:147.

Angebault C, Gueguen N, Desquiret-dumas V, Chevrollier A, Guillet V, Verny C, Cassereau J, Ferre M, Milea D, Amati-bonneau P, Bonneau D, Procaccio V, Reynier P & Loiseau D (2011). Idebenone increases mitochondrial complex I activity in fibroblasts from LHONpatients while producing contradictory effects on respiration. *BMC research notes*. 4:557.

Ardlie K, Kruglyak L & Seielstad M (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 3:299-309.

Assink J, Tijmes N, Brink J, Ostra R, Riemslag F, Jong P & Bergen A (1997). A gene for X-Linked optic atrophy is closely linked to the Xpl1.4-Xpl1.2 region of the X chromosome. *The American Journal of Human Genetics*. 6:934-939.

Aung T, Ocaka L, Ebenezer N, Morris A, Krawczak M, Thiselton D, Alexander C, Votruba M, Brice G, Child A, Francis P, Hitchings R, Lehmann O & Bhattacharya S (2002). A major marker for normal tension glaucoma: association with polymorphisms in the OPA1 gene. *Human Genetics*. 110:52-56.

Ballinger S, Shoffner J, Hedaya E, Trounce I, Polak M, Koontz D, Wallace D (1992). Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 Kb mitochondrial DNA deletion. *Nature Genetics*. 1:11-15.

Ban M (2006). DNA Sequencing and PCR Methods. *Advances in Clinical Neuroscience & Rehabilitation*. 5:18-19.

Ban T, Heymann J, Song Z, Hinshaw J & Chan D (2010). OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tabulation. *Human Molecular Genetics*. 19:2113-2122.

Baralle D & Baralle M (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of Medical Genetics*. 42:737-748.

Barboni P, Savini G, Valentino M, Morgia C, Bellusci C, Negri A, Sadun F, Carta A, Carbonelli M, Sadun A & Carelli V (2006). Leber's Hereditary Optic Neuropathy with Childhood Onset. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 47:5303-5309.

Barnils N, Mesa E, Muñoz S & Arruga J (2007). Response to idebenone and multivitamin therapy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 82:377-380.

Barrett L, Fletcher S & Wilton S (2012). Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and Molecular Life Sciences*.

Barrientos A & Moraes C (1999). Titrating the Effects of Mitochondrial Complex I Impairment in the Cell Physiology. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:16188-16197.

Bartlett J & Stirling D (2003). *PCR protocols*. 2nd edition. Humana Press. Totowa, New Jersey.

Battisti C, Formichi P, Cardaioli E, Bianchi S, Mangiavacchi P, Tripodi S, Tosi P & Federico A (2004). Cell response to oxidative stress induced apoptosis in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 75:1731-1736.

Besch D, Leo-Kottler B, Zrenner E, Wissinger B (1999). Leber's hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings in a patient with a new mutation in the ND6 gene. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*. 237:745-752.

Betts & Russel. Amino Acid properties and consequences of substitutions, *in*: *Bioinformatics for geneticists*. Barnes M & Gray I (2003). 1ª edição. Wiley, John & Sons. United Kingdom.

Biousse V, Brown M, Newman N, Allen J, Rosenfeld J, Meola G & Wallace D (1997). De novo 14484 mitochondrial DNA mutation in monozygotic twins discordant for Leber's hereditary optic neuropathy. *Neurology*. 49:1136-1138.

Blakely E, Silva R, King A, Schwarzer V, Harrower T, Dawidek G, Turnbull D & Taylor R (2005). LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial ND1 gene mutation. *European Journal of Human Genetics*. 13:623-627.

Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó F & Viña J (2003). Mitochondria from females exhibit higher antioxidante gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology & Medicine*. 34:546 -552.

Borrás C, Gambini J & Viña J (2007). Mitochondrial oxidant generation is involved in determining why females live longer than males. *Frontiers in Bioscience.* 12:1008-1013.

Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bougeois M, Viegas-Péquignot E, Münnich A & Rötig A (1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genetics*. 11:144-149.

Brown M, Trounce I, Jun A, Allen J & Wallace D (2000). Functional Analysis of Lymphoblast and Cybrid Mitochondria Containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's Hereditary Optic Neuropathy Mitochondrial DNA Mutation. *The Journal of Biological Chemistry*. 275:39831-39836.

Brown M, Starikovskaya E, Derbeneva O, Hosseini S, Allen J, Mikhailovskaya I, Sukernik R & Wallace D (2002). The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J. *Human Genetics*. 110:130-138.

Carelli V, Giordano C & Amati G (2003). Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear–mitochondrial interaction. *Trends in Genetics*. 19:257-262.

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K & Patil N (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nature Genetics*. 22:231-238.

Cartegni L, Chew S & Krainer A (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*. 3:285-298.

Chalmers R & Harding A (1996). A case-control study of Leber's hereditary optic neuropathy. Brain. 119:1481-1486.

Chan D (2006). Mitochondria: Dynamic organelles in disease, aging, and development. Cell. 125:1241-1252.

Chen H, Detmer S, Ewald A, Griffin E, Fraser S & Chan D (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of Cell Biology*. 160:189-200.

Chen H, Chomyn A & Chan D (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:26185-26192.

Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo M, Verny C, Ferre M, Dollfus H, Odent S, Milea D, Goizet C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D & Reynier P (2008). Hereditary Optic Neuropathies Share a Common Mitochondrial Coupling Defect. *Annals of Neurology*. 63:794-798.

Chinnery P, Howell N, Andrews R & Turnbull D (1999). Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity. *Journal of Medical Genetics*. 36:505-510.

Chinnery P, Brown D, Andrews R, Singh-Kler R, Riordan-Eva P, Lindley J, Applegarth A, Turnbull D, Howell N (2001). The mitochondrial ND6 gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 124:209-218.

Cohn A, Toomes C, Potter C, Towns K, Hewitt A, Inglehearn C, Craig J & Mackey D (2007). Autosomal Dominant Optic Atrophy: Penetrance and Expressivity in Patients With OPA1 Mutations. *American Journal of Ophthalmology.* 143:656-662.

Cooper T, Wan L & Dreyfuss G (2009). RNA and disease. *Cell*. 136:777-793.

Dale J, Schantz M & Plant N (2012). *From genes to genomes – concepts and applications of DNA technology*. 3ª edição. John Wiley & Sons. United Kingdom.

Davies V, Powell K, White K, Yip W, Hogan V, Hollins A, Davies J, Piechota M, Brownstein D, Moat S, Nichols P, Wride M, Boulton M & Votruba M (2008). A missense mutation in the murine *Opa3* gene models human Costeff syndrome. *Brain*. 131:368-380.

Delettre C, Griffoin J, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P & Hamel C (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Human Genetics*. 109:584-591.

Delettre C, Lenaers G, Pelloquin L, Belenguer P & Hamel C (2002). OPA1 (Kjer Type) Dominant Optic Atrophy: a novel mitochondrial disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 75:97-107.

De Vries D, Went L, Bruyn G, Scholte H, Hofstra M, Bolhuis P & van Oost B (1996). Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. *American Journal of Human Genetics* 58:703-711.

DiMauro S (2007). Mitochondrial DNA medicine. *Bioscience Reports*. 27:5-9.

DiMauro S & Schon E (2008). Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*. 31:91-123.

Dugan K, Lawrence H, Hares D, Fisher C & Budowle B (2002). An improved method for post-PCR purification for mtDNA Sequence Analysis. *Journal of Forensic Sciences*. 47:811-818.

Dunnen & Antonarakis (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mutation*. 15:7-12.

Egger G, Liang G, Aparicio A & Jones P (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 429:457-463.

Eiberg H, Hansen L, Kjer B, Hansen T, Pedersen O, Bille M, Rosenberg T & Tranebjærg L (2006). Autosomal dominant optic atrophy associated with hearing impairment and impaired glucose regulation caused by a missense mutation in the WFS1 gene. *Journal of Medical Genetics*. 43:435-440.

Elles R & Mountford R (2004). *Molecular diagnosis of genetic diseases*. 2ª edição. Humana press. Totowa, New Jersey.

Enns G, Bai R, Beck A & Wong L (2006). Molecular–clinical correlations in a family with variable tissue mitochondrial DNA T8993G mutant load. *Molecular Genetics and Metabolism*. 88:364-371.

Ferré M, Amati-Bonneau P, Tourmen Y, Malthiery Y & Reynier P (2005). *eOPA1*: An online database for *OPA1* mutations. *Human Mutation*. 25:423-428.

Ferré M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dollfus H, Ayuso C, Defoort S, Vignal C, Zanlonghi X, Charlin J, Kaplan J, Odent S, Hamel C, Procaccio V, Reynier P & Amati-Bonneau P (2009). Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel opa1 mutations. *Human Mutation*. 30:692-705.

Floreani M, Napoli E, Martinuzzi A, Pantano G, Riva V, Trevisan R, Bisetto E, Valente L, Carelli V & Dabbeni-Sala F (2005). Antioxidant defences in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *The FEBS Journal*. 272:1124-1135.

Frezza C, Cipolat S, Brito O, Micaroni M, Beznoussenko G, Rudka T, Bartoli D, Polishuck R, Danial N, Strooper B & Scorrano L (2006). OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell*. 126:177-189.

Wilkie G, Dickson K & Gray N (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in Biochemical Sciences*. 28:182-188.

Ghelli A, Zanna C, Porcelli A, Schapira A, Murtinuzzi A, Carelli V & Rugolo M (2003). Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) pathogenic mutations induce mitochondrial-dependent apoptotic death in transmitochondrial cells incubated with galactose medium. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:4145-4150.

Gómez-Durán A, Pacheu-Grau D, Martínez-Romero Í, López-Gallardo E, López-Pérez M, Montoya J & Ruiz-Pesini E (2012). Oxidative phosphorylation differences between mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1822:1216-1222.

Graefe V (1858). Ein ungewoehnlicher fall von hereditaerer amaurose. *Archives of ophthalmology*. 4:266-268.

Griffiths A, Wessler S, Lewontin R & Carrol S (2000). *Introduction to genetic analysis*. 7ª edição. W. H. Freeman. New York.

Grazina M (2004). Genoma mitocondrial e défice energético no diagnóstico das doenças da cadeia respiratória mitocondrial. Coimbra: Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra. Tese de doutoramento.

Grazina M, Diogo L, Garcia P, Silva E, Garcia T, Robalo C & Oliveira C (2007). Atypical presentation of Leber's hereditary optic neuropathy associated to mtDNA 11778G> A point mutation – A case report. *European Journal of Paediatric Neurology* 2007. 11:115-118.

Gropman A, Chen T, Perng C, Krasnewich D, Chernoff E, Tifft C & Wong L (2004). Variable Clinical Manifestation of Homoplasmic G14459A Mitochondrial DNA Mutation. *American Journal of Medical Genetics*. 124A:377-382.

Guy J, Shaw G, Ross-Cisneros F, Quiros P, Salomao S, Berezovsky A, Carelli V, Feuer W & Sadun A (2008). Phosphorylated neurofilament heavy chain is a marker of neurodegeneration in Leber hereditary optic neuropathy (LHON). *Molecular Vision*. 14:2443-2450.

Ho G, Walter J & Christodoulou J (2008). Costeff optic atrophy syndrome: New clinical case and novel molecular findings. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 31:419-423.

Holt I, Harding A & Morgan-Hughes J (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 331:717-719.

Hoogendoorn B, Coleman S, Guy C, Smith K, Bowen T, Buckland P & O'Donovan M (2003). Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Human Molecular Genetics*. 12:2249-2254.

Howell N, Kubacka I, Xu M & McCullough D (1991). Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial ND1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. *American Journal of Human Genetics*. 48:935-942.

Howell N (1998a). Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve. *Vision Research*. 38:1495-1504.

Howell N, Bogolin C, Jamieson R, Marenda D & Mackey D (1998b). mtDNA mutations that cause optic neuropathy: how do we know? *American Journal of Human Genetics*. 62:196-202.

Howell N, Herrnstadt C, Shults C & Mackey D (2003). Low Penetrance of the 14484 LHON Mutation When It Arises in a Non-Haplogroup J mtDNA Background. *American Journal of Medical Genetics*. 119A:147-151.

Hudson G & Chinnery P (2006). Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Human Molecular Genetics*. 15:244-252.

Hudson G, Carelli V, Horvath R, Zeviani M, Smeets H & Chinnery P (2007). X-Inactivation patterns in females harboring mtDNA mutations that cause Leber hereditary optic neuropathy. Molecular Vision. 13:2339-2343.

Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely E, Stewart J, He L, Schaefer A, Griffiths P, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull D, Chinnery P & Taylor R (2008). Mutation of *OPA1* causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain*. 131:329-337.

Hudson G, Man P, Griffiths P, Caporali L, Salomao S, Berezovsky A, Carelli V, Zeviani M & Chinnery P (2010). Variation in OPA1 does not explain the incomplete penetrance of Leber hereditary optic neuropathy. *Molecular Vision*. 16:2760-2764.

Hudson G, Man P, Griffiths P, Horvath R, Carelli V, Zeviani M & Chinnery P (2011). Variation in MAPT is not a contributing factor to the incomplete penetrance in LHON. *Mitochondrion*. 11:620-622.

Huizing M, Dorward H, Ly L, Klootwijk E, Kleta R, Skovby F, Pei W, Feldman B, Gahl W & Anikster Y (2010). OPA3, mutated in 3-methylglutaconic aciduria type III, encodes two transcripts targeted primarily to mitochondria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 100:149-154.

Huoponen K, Villki J, Aula P, Nikoskelainen E & Savontaus M (1991). A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. *The American Journal of Human Genetics*. 48: 1147-1153.

Huoponen K (2001). Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. *Neurogenetics*. 3:119-125.

Hutchison C (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*. 35:6227-6237.

Jaffe A, Wojcik G, Chu A, Golozar A, Maroo A, Duggal P & Klein A (2011). Identification of functional genetic variation in exome sequence analysis. *BMC proceedings*. 5:9-13.

Johns D, Neufeld M & Park R (1992). An ND6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 187:1551-1557.

Johns D, Smith K, Miller N, Sulewski M & Bias W (1993). Identical twins who are discordant for Leber's hereditary optic neuropathy. *Archives of Ophthalmology*. 111:1491-1494.

Jun A, Brown M & Wallace D (1994). A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrigenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:6206-6210.

Kaukonen J, Juselius J, Tirani V, Kyttala A, Zeviani M, Comi G, Keranen S, Peltonen L & Suomalainen A (2000). Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*. 289:782-785.

Kelley J. Automated Dye – terminator DNA sequencing, *in*: *Automated DNA sequencing and analysis*. Adams M, Fields C & Venter J (1994). 1ª edição. Academic Press. London.

Kieleczawa J (2005). *DNA sequencing: optimizing the process and analysis, Volume 1*. 1ª edição. Jones and Bartlett. Sudbury, Canada.

Kim J, Hwang J & Park 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*. 51:630-634.

Kim J, Hwang J, Ko H, Seong M, Park B & Park S (2005). Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology*. 64:966-972.

Kirches E (2011). LHON: Mitochondrial mutations and more. *Current Genomics*. 12:44-54.

Kleta R, Skovby F, Christensen E, Rosenberg T, Gahl W & Anikster Y (2002). 3-Methylglutaconic aciduria type III in a non-Iraqi-Jewish kindred: clinical and molecular findings. *Molecular Genetics and Metabolism*. 76:201-206.

Koilkonda R & Guy J (2011). Leber's hereditary optic neuropathy-gene therapy: from benchtop to bedside. *Journal of Ophthalmology*.

Komar A (2007). Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics*. 8:1075-1080.

Kudin A, Bimpong-Buta N, Vielhaber S, Elger C & Kunz W. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 279:4127-4135.

Kumaramanickavel G, Aung T, Sripriya S, Waseem N, Okada K, Seah S, Baskaran M, Mishima H, Vithana E & Bhattacharya S (2005). Lack of association of IVS8+4 C/T and IVS8+32 T/C Polymorphisms in the *OPA1* Gene With Normal Tension Glaucoma in Patients From Singapore, India and Japan. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 46:3811.

Lander E (1996). The new genomics: global views of biology. *Science*. 274:536-539.

Landes T, Leroy I, Bertholet A, Diot A, Khosrobakhsh F, Daloyau M, Davezac N, Miquel M, Courilleau D, Guillou E, Olichon A, Lenaers G, Arnauné-Pelloquin L, Emorine L & Belenguer P (2010). OPA1 (dys)functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 21:593-598.

Leber T (1871). Ueber hereditäre und congenital-angelegte Sehnervenleiden. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 17:249-291.

Lee Y, Jeong S, Karbowski M, Smith C & Youle R (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*. 15:5001-5011.

Lightowlers R, Chinnery P, Turnbull D & Howell N (1997). Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics*. 13:450-455.

Liu Y, Schmidt S, Qin X, Gibson J, Munro D, Wiggs J, Hauser M & Allingham R (2007). No association between OPA1 polymorphisms and primary open-angle glaucoma in three different populations. *Molecular Vision*. 13:2137-2141.

Lodish H, Berk A, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Bretscher A, Ploegh H & Matsudaira P (2007). *Molecular Cell Biology.* 6ª edição. WH Freeman & Company. New York.

Lopes M, Joyce C, Ritchie G, John S, Cunningham F, Asimit J & Zeggini E (2012). A combined functional annotation score for non-synonymous variants. *Human Heredity*. 73:47-51.

Lopes R & Souza D. Fundamentos da engenharia genética, *in*: *Biossegurança de OGM: uma visão integradas*. Costa & Costa (2009). 1ª edição. Publit soluções editoriais. Rio de Janeiro.

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L & Afzelius B (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratoy control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *The Journal of Clinical Investigation*. 41:1776-1804.

Mackey D & Howell N (1992). A variant of Leber hereditary optic neuropathy characterized by recovery of vision and by an unusual mitochondrial genetic etiology. *The American Journal of Human Genetics*. 51:1218-1228.

Man P, Turnbull D & Chinnery P (2002). Leber hereditary optic neuropathy. *Journal of Medical* Genetics. 39:162-169.

Man P, Griffiths P, Brown D, Howell N, Turnbull D & Chinnery P (2003). The Epidemiology of Leber Hereditary Optic Neuropathy in the North East of England. *The American Journal of Human Genetics*. 72:333-339.

Man P, Griffiths P, Hudson G & Chinnery P (2009a). Inherited mitochondrial optic neuropathies. *Journal of Medical Genetics*. 46:145-158.

Man P, Stewart J, Hudson G, Andrews R, Griffiths P, Birch M & Chinnery P (2009b). OPA1 increase s the risk of normal but not high tension glaucoma. *Journal of Medical Genetics*. 47:120-125.

Man P, Griffiths P, Burke A, Sellar P, Clarke M, Gnanaraj L, Ah-Kine D, Hudson G, Czermin B, Taylor R, Horvath R & Chinnery P (2010a). The Prevalence and Natural History of Dominant Optic Atrophy Due to OPA1 Mutations. *Ophthalmology*. 117:1538-1546.

Man P, Griffiths P, Gorman G, Lourenco C, Wright A, Auer-Grumbach M, Toscano A, Musumeci O, Valentino M, Caporali L, Lamperti C, Tallaksen C, Duffey P, Miller J, Whittaker R, Baker M, Jackson M, Clarke M, Dhillon B, Czermin B, Stewart J,

Hudson J, Reynier P, Bonneau D,Marques W, Lenaers G, McFarland R, Taylor R, Turnbull D, Votruba M, Zeviani M, Carelli V, Bindoff L, Horvath R, Amati-Bonneau P & Chinnery P (2010b). Multi-system neurological disease is common in patients with *OPA1* mutations. *Brain*. 133:771-786.

Man P, Stewart J, Hudson G, Andrews R, Griffiths P, Birch M & Chinnery P (2010c). OPA1 increases the risk of normal but not high tension glaucoma. *Journal of Medical Genetics*. 47:102-105.

Man P, Griffiths P & Chinnery P (2011). Mitochondrial optic neuropathies – Disease mechanisms and therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*. 30:81-114.

Man P, Shankar S, Biousse V, Miller N, Bean L, Coffee B, Hegde M & Newman N (2011). Genetic screening for OPA1 and OPA3 mutations in patients with suspected inherited optic neuropathies. *Ophthalmology*. 118:558-563.

Mann M & Jensen O (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*. 21:255-261.

Mabuchi F, Tang S, Kashiwagi K, Yamagata Z, Iijima H, Tsukahara S (2007). The OPA1 gene polymorphism is associated with normal tension and high tension glaucoma. *American Journal of Ophthalmology*. 143:125-130.

Markham A (1993). The polymerase chain reaction: a tool for molecular medicine. *Basic Molecular and Cell Biology*. 306:441-446.

Mascialino B, Leinonen M & Meier T (2011). Meta-analysis of the prevalence of Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations in Europe. *European Journal of Ophthalmology*. 22:461-465.

Mashima Y, Kigasawa Z, Wakakura M & Oguchi Y (2000). Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 20:166-170.

Mazumder B, Seshadri V & Fox P (2003). Translational control by the 3'UTR: the ends specify the means. *Trends in Biochemical Sciences*. 28:91-98.

McFarland R & Turnbull D (2009). Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *Journal of Internal Medicine*. 265:210-228.

McPherson M & Møller S (2006). *PCR*. 2ª edição. Taylor & Francis group. New York.

Melberg A, Moslem A, Palm O, Raininko R, Stålberg E & Oldfors A (2009). A patient with two mitochondrial DNA mutations causing PEO and LHON. *European Journal of Medical* Genetics. 52:47-48.

Metzker M (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Research*. 15:1767-1776.

Miller & Kumar (2001). Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Human Molecular Genetics*. 10:2319-2328.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 51 :263-273.

Nakamura M, Lin J, Ueno S, Asaoka R, Hirai T, Hotta Y, Miyake Y & Terasaki H (2006). Novel mutations in the OPA1 gene and associated clinical features in japanese patients with optic atrophy. *Ophthalmology*. 113:483-488.

Neas K, Bennetts B, Carpenter K, White R, Kirk E, Wilson M, Kelley R, Baric & I Christodoulou (2005). OPA3 mutation screening in patients with unexplained 3-methylglutaconic aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 28:525-532.

Newman N (2002). From Genotype to Phenotype in Leber Hereditary Optic Neuropathy: Still More Questions than Answers. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 22:257-261.

Nikoskelainen E, Marttila R, Huoponen K, Juvonen V, LaMIMnen T, Sonninen P & Savontaus M (1995). Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2:160-164.

Ng P & Henikoff S (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*. 31:3812-3814.

Okamoto K & Shaw J (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual Review of Genetics*. 39:503-536.

Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P & Lenaers G (2003). Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:7743-7746.

Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P & Lenaers G (2007a). OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 14:682-692.

Olichon A, Mils V, Arnauné-Pelloquin L, Emorine L, Ghichet A, Delettre C, Hamel C, Amati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D, Lenaers G & Belenguer P (2007b). Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *Journal of Cellular Physiology*. 2:423-430.

Padgett R (2012). New connections between splicing and human disease. *Trends in Genetics*. 28:147-154.

Palace J (2009). Multiple sclerosis associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*. 286:24-27.

Pei W, Kratz L, Bernardini I, Sood R, Yokogawa T, Dorward H, Ciccone C, Kelley R, Anikster Y, Burgess H, Huizing M & Feldman B (2010). A model of Costeff syndrome reveals metabolic and protective functions of mitochondrial OPA3. *Development*. 137:2587-2596.

Pello R, Martín M, Carelli V, Nijtmans L, Achilli A, Pala M, Torroni A, Gómez-Durán A, Ruiz-Pesini E, Martinuzzi A, Smeitink J, Arenas J & Ugalde C (2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Human Molecular Genetics*. 17:4001-4011.

Pelt-Verkuil E, Belkum A & Hays J (2008). *Technical aspects and principles of PCR amplification*. 1ª edição. Springer. Dordrecht, Holanda.

Pesch U, Leo-Kottler B, Mayer S, Jurklies B, Kellner U, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Alexander C & Wissinger B (2001). OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. *Human Molecular Genetics*. 10:1359-1368.

Phasukkijwatana N, Kunhapan B, Stankovich J, Chuenkongkaew W, Thomson R, Thornton T, Bahlo M, Mushiroda T, Nakamura Y, Mahasirimongkol S, Tun AW, Srisawat C, Limwongse C, Peerapittayamongkol C, Sura T, Suthammarak W & Lertrit P (2010). Genome-wide linkage scan and association study of PARL to the expression of LHON families in Thailand. *Human Genetics*. 128:39-49.

Pitkänen S & Robinson B (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *The Journal of Clinical Investigation*. 98:345-351.

Potluri P, Davila A, Ruiz-Pesini E, Mishmar D, O'Hearn S, Hancock S, Simon M, Scheffler I, Wallace D & Procaccio V (2009). A novel NDUFA1 mutation leads to a progressive mitochondrial. *Molecular Genetics and Metabolism*. 96:189-195.

Powell B, Toomes C, Scott S, Yeung A, Marchbank N, Spry P, Lumb R, Inglehearn C & Churchill A (2003). Polymorphisms in OPA1 are associated with normal tension glaucoma. *Molecular Vision*. 9:460-464.

Powell K, Davies J, Taylor E, Wride M & Votruba M (2011). Mitochondrial Localization and Ocular Expression of Mutant Opa3 in a Mouse Model of 3-Methylglutaconicaciduria Type III. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52:4369-4380.

Puomila A, Huoponen K, Mäntyjärv M, Hämäläinen P, Paananen R, Sankila E, Savontaus M, Somer M & Nikoskelainen E (2005). Dominant optic atrophy: correlation between clinical and molecular genetic studies. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 83:337-346.

Puomila A, Hämäläinen P, Kivioja S, Savontaus M, Koivumäki S, Huoponen K & Nikoskelainen E (2007). Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *European Journal of Human Genetics*. 15:1079-1089.

Ramensky V, Bork P & Sunyaev S (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research*. 30:3894-3900.

Ramos V, Bellusci C, Savini G, Carbonelli M, Berezovsky A, Tamaki C, Cinoto R, Sacai P, Filho M, Miura H, Valentino M, Lommarini L, Negri A, Sadun F, Cortelli P, Montagna P, Salomao S, Sadun A, Carelli V & Barboni P (2009). Association of optic disc size with development and prognosis of Leber's hereditary optic neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 50:1666-1674.

Reese M, Eeckman F, Kulp D & Haussler D (1997). Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology*. 4:311-323.

Reeve A, Krishnan K & Turnbull D (2008). Mitochondrial DNA mutations in disease, aging, and neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1147:21-29.

Reich D, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti P, Richter D, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian S, Ward R & Lander E (2001). Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*. 411:199-204.

Reynier P, Amati-Bonneau P, Verny C, Olichon A, Simard G, Guichet A, Bonnemains C, Malecaze F, Malinge MC, Pelletier JB, Calvas P, Dollfus H, Belenguer P, Malthièry Y, Lenaers G & Bonneau D (2004). OPA3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. *Journal of Medical Genetics*. 41:e110.

Rodenhiser D & Mann M (2006). Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Canadian Medical Association Journal*. 174:341-348.

Rodríguez-Cuenca S, Pujol E, Justo R, Frontera M, Oliver J, Gianotti M & Roca P (2002). Sex-dependent thermogenesis, differences in mitochondrial morphology and function, and adrenergic response in brown adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 42958-42963.

Rose E (1991). Applications of the polymerase chain reaction to genome analysis. *FASEB Journal*. 5:46-54.

Rötig A, Colonna M, Blanche S, Fischer A, LeDeist F, Frezal J, Saudubray J & Munnich A (1988). Deletion of blood mitochondrial DNA in pancytopenia. *Lancet*. 2:567-568.

Rötig A & Munnich A (2003). Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders. *Journal of the American Society of Nephrology*. 14:2995-3007.

Ryu S, Jeong H, Choi M, Karbowski M & Choi C (2010). Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67:2839-2850.

Sadun A, Carelli V, Salomao S, Berezovsky A, Quiros P, Sadun F, Enegri A, Andrade R, Moraes M, Passos A, Kjaer P, Pereira J, Valentino M, Schein S & Belfort R (2003). Extensive Investigation of a Large Brazilian Pedigree of 11778/Haplogroup J Leber Hereditary Optic Neuropathy. *American Journal of Ophthalmology*. 136:231-238.

Sanchez J, Corthals G & Hochstrasser D (2004). *Biomedical applications of proteomics*. 1ª edição. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim.

Sanger F, Nicklen S & Coulson A (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 74:5463-5467.

Sarkar A (2009). *Biology of cancer*. 1ª edição. Discovery Publishing House. Nova Deli.

Sato M, Kawase K, Yamamoto T, Dubo S, Shink E, Si E & Raymond V (2003). Lack of Association between Normal-tension Glaucoma and Intron 8 Polymorphisms in the Gene Causing Autosomal Dominant Optic Atrophy, OPA1, in Japan. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 44:1124-B20.

Schaaf C, Zschocke J & Potocki L (2012). *Human genetics: from molecules to medicine*. 1ª edição. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health. Filadélfia.

Schaefer A, Taylor R, Turnbull D & Chinnery P (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders-past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1659:115-120.

Schaefer A, McFarland R, Blakely E, He L, Whittaker R, Taylor R, Chinnery P & Turnbull D (2008). Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Annals of Neurology*. 63:35-39.

Schoeler S, Winkler-Stuck K, Szibor R, Haroon M, Gellerich F, Chamaon K, Mawrin C & Kirches E (2007). Glutathione depletion in antioxidant defense of differentiated NT2-LHON cybrids. *Neurobiology of Disease*. 536-544.

Shendure J, Porreca G & Church (2008). Overview of DNA sequencing strategies. *Current Protocols in Molecular Biology*. 81:7.1.1-7.1.11.

Shimizu S, Mori N, Kishi M, Sugata H, Tsuda A & Kubota N (2003). A novel mutation in the OPA1 gene in a Japanese patient with optic atrophy. *American Journal of Ophthalmology*. 135:256-257.

Shu L, Zhang Y, Huang X, Chen C & Zhang X (2012). Complete mitochondrial DNA sequence analysis in two southern Chinese pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy revealed secondary mutations along with the primary mutation. *International Journal of Ophthalmology*. 5:28-31.

Schwartz M & Vissing J (2002). Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *The New England Journal of Medicine*. 347:576-580.

Sitarz K, Chinnery P & Man P (2012a). Disorders of the optic nerve in mitochondrial cytopathies: new ideas on pathogenesis and therapeutic targets. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 12:308-317.

Sitarz K, Man P, Hudson G, Jacob A, Boggild M, Horvath R & Chinnery P (2012b). Genetic variations within the OPA1 gene are not associated with neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis Journal*. 18:240-243.

Smith K, Johns D, Heher K & Miller N (1993). Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Archives of Ophthalmology*. 111:1486-1490.

Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C & Chan D (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of Cell Biology*. 178:749-755.

Song Z, Ghochani M, McCaffery J, Frey T & Chan D (2009). Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion. *Molecular Biology of the Cell*. 20:3525-3532.

Spelbrink J, Li F, Tiranti V, Nikali K, Yuan Q, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi G, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs H, Zeviani M & Larsson C (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genetics*. 28:223-231.

Spencer P & Barral J (2012). Genetic code redundancy and its influence on the encoded polypeptides. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.

Spinazzola A, Invernizzi F, Carrara F, Lamantea E, Donati A, DiRocco M, Giordano I, Meznaric-Petrusa M, Baruffini E, Ferrero I & Zeviani M (2009). Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 32:143-158.

Stewart J, Hudson G, Man P, Blakeley E, He L, Horvath R, Maddison P, Wright A, Griffiths P, Turnbull D, Taylor R & Chinnery P (2008). *Neurology*. 71:1829-1831.

Strausberg R, Levy S & Rogers Y (2008). Emerging DNA sequencing technologies for human genomic medicine. *Drug Discovery Today*. 13:569-577.

Taylor R & Turnbull D (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 6:389-402.

Tillett D & Neilan B (1999). n-butanol purification of dye terminator sequencing reactions. *Biotechniques*. 26:606-608.

Tońska K, Kodroń A & Bartnik E (2010). Genotype-phenotype correlations in Leber hereditary optic neuropathy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797:1119-1123.

Toomes C, Marchbank N, Mackey D, Craig J, Newbury-Ecob R, Bennett C, Vize C, Desai S, Black G, Patel N, Teimory M, Markham A, Inglehearn C & Churchill A (2001). Spectrum, frequency and penetrance of *OPA1* mutations in dominant optic atrophy. *Human Molecular Genetics*. 10:1369-1378.

Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, Sellitto D, Zeviani M, Carrara F, Carducci C, Leuzzi V, Carelli V, Barboni P, De Negri A & Scozzari R (1997). 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 of Human Genetics*. 60:1107-1121.

Tsao K, Aitken P & Johns D (1999). Smoking as an aetiological factor in a pedigree with Leber's hereditary optic neuropathy. *The British Journal of Ophthalmology*. 83:577-581.

Tuppen H, Blakely E, Turnbull D & Taylor R (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797:113-128.

UniProt Consortium (2012). Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*. 40:71-75.

Uusimaa J, Remes A, Rantaka H, Vainionpää L, Herva R, Vuopala K, Nuutinen M, Majamaa K & Hassinen I (2000). Childhood encephalopathies and myopathies: a prospective study in a defined population to assess the frequency of mitochondrial disorders. *Pediatrics*. 105:598-603.

Valentino M, 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. *Annals of Neurology*. 51:774-778.

Valentino M, Barboni P, Ghelli A, Bucchi L, Rengo C, Achilli A, Torroni A, Lugaresi A, Lodi R, Barbiroli B, Dotti M, Federico A, Baruzzi A & Carelli V (2004). The ND1 gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy. *Annals of Neurology*. 56:631-641.

Vanopdenbosch L, Dubois B, D'Hooghe M-B, Meire F & Carton H (2000). Mitochondrial mutations of Leber's hereditary optic neuropathy: a risk factor for multiple sclerosis. *Journal of Neurology*. 247:535-543.

Verny C, Loiseau D, Scherer C, Lejeune P, Chevrollier A, Gueguen N, Guillet V, Dubas F, Reynier P, Amati-Bonneau P & Bonneau D (2008). Multiple sclerosis-like disorder in OPA1-related autosomal dominant optic atrophy. *Neurology*. 70:1152-1153.

Viljoen G, Nel L & CrowtherJ (2005). *Molecular diagnostic PCR handbook*. 1ª edição. Springer. Dordrecht, Holanda.

Vitkup D, Sander C & Church G (2003). The amino-acid mutational spectrum of human genetic disease. *Genome biology*. 4:R72.

Votruba M (2004). Molecular genetic basis of primary inherited optic neuropathies. *Eye*. 18:1126-1132.

Wallace D, Singh G, Lott M, Hodge J, Schurr T, Lezza A, Elsas L & Nikoskelainen E (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 242:1427-30.

Wallace D, Brown M & Lott M (1999). Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 238:211-230.

Wallace D & Fan W (2009). The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes & Development.* 23:1714-1736.

Wallace D & Fan W (2010). Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*. 10:12-31.

Wallace D, Fan W & Procaccio V (2010). Mitochondrial energetic and therapeutics. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 5:297-348.

Ward A & Cooper T (2010). The pathobiology of spicing. *The Journal of Pathology*. 220:152-163.

Wei P, Liu X & Fu Y (2011). Incorporating predicted functions of nonsynonymous variants into gene-based analysis of exome sequencing data: a comparative study. *BMC proceedings*. 5:9-S20.

Wilkie G, Dickson K & Gray N (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends in Biochemical Sciences*. 28:182-188.

Woo S, Kim D, Kim J, Park S, Ko H & Yoo T (2004). Investigation of the association between OPA1 polymorphisms and normal-tension glaucoma in Korea. *Journal of Glaucoma*. 13:492-495.

Wolf C, Gramer E, Müller-Myhsok B, Pasutto F, Reinthal E, Wissinger B & Weisschuh N (2009). Evaluation of nine candidate genes in patients with normal tension glaucoma: a case control study. *BMC Medical Genetics*. 10:91.

Wong A, Cavelier L, Collins-Schramm H, Seldin M, McGrogan M, Savontaus M & Cortopassi (2002). Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Human Molecular Genetics*. 11:431-438.

Wong M & Medrano J (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 39:75-85.

Wong L (2010). Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Developmental Disabilities Research Reviews*. 16:154-162.

Woo S, Kim D, Kim J, Park S, Ko H & Yoo T (2004). Investigation of the association between OPA1 polymorphisms and normal-tension glaucoma in Korea. *Journal of Glaucoma*. 13:492-495.

Wortmann S, Kluijtmans L, Engelke U, Wevers R & Morava E (2012). The 3-methylglu taconic acidurias: what 's new? *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 35:13-22.

Yao W, Jiao X, Hejtmancik F, Leske C, Hennis A & Nemesure B (2006). Evaluation of the association between OPA1 polymorphisms and primary open-angle glaucoma in Barbados families. *Molecular Vision*. 12:649-654.

Yen M, Wang A & Wei Y (2006). Leber´s hereditary optic neuropathy: a multifactorial disease. *Progress in Retinal and Eye Research.* 25:381-396.

Yen M, Wang A, Lin Y, Fann M & Hsiao K (2010). Novel Mutations of the OPA1 Gene in Chinese Dominant Optic Atrophy. *Ophthalmology*. 117:392-396.

Zanna C, Ghelli A, Porcelli A, Karbowski M, Youle R, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, Valentino M, Rugolo M & Carelli V (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain*. 131:352-367.

Zhang A, Jia X, Zhang Q & Yao Y (2010). No association between the SNPs (*rs3749446* and *rs1402000*) in the PARL gene and LHON in Chinese patients with m.11778G>A. *Human Genetics*. 128:465-468.