



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANA CARLA DANTAS FERREIRA

INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA
EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL

MANAUS
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANA CARLA DANTAS FERREIRA

INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA
EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS
2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

F383i Ferreira, Ana Carla Dantas
Instabilidade do DNA mitocondrial na oftalmoplegia externa
crônica progressiva: estudo familiar / Ana Carla Dantas Ferreira .
2020
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Pereira de Moura Neto
Coorientador: Emerson Silva Lima
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Doença Mitocondrial. 2. Miopatia. 3. Oftalmoplegia. 4.
Genótipo. 5. Polimorfismo. I. Moura Neto, José Pereira de. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANA CARLA DANTAS FERREIRA

**INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA
EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson Silva Lima - Presidente

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

UNINILTON/FMT-HVD

Prof. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida

Universidade Federal do Amazonas

Manaus, 31 de Janeiro de 2020

Dedico este trabalho à minha amada mãe Rosames Dantas Ferreira (*in memoriam*), que no início desta pesquisa foi meu alicerce, deixando seus ensinamentos para a minha vida. “Não existe partida para aqueles que continuam em nossos corações”. Gratidão por ter uma mãe tão maravilhosa, sem você eu não chegaria aqui! Meus méritos são todos seus!

AGRADECIMENTOS

Ao bondoso Deus pelo dom da vida!

Aos meus amados pais Raimundo Garcia Ferreira e Rosames Dantas Ferreira (*in memoriam*) por todo amor, educação e carinho. Em especial à minha querida mãe que desde o início desta caminhada foi a razão das minhas conquistas. Fonte inesgotável de amor e compreensão. Sempre esteve ao meu lado e diante das adversidade foi meu porto seguro. Teu eterno exemplo levarei para toda a minha vida!

Ao meu filho André Kauê Ferreira Cid. Você é a razão da minha vida! Ser sua mãe é dávida de Deus. Agradeço ao senhor por me tornar mãe, serei sempre presente na sua educação, ensinamento e nunca desistirei de sua felicidade!

Aos meus amados irmãos Robson Dantas Ferreira e Renê Dantas Ferreira. As minhas cunhadas e meus sobrinhos Flávia Argemiro, Ecclesiane Dias, Clara Yasmim, Ryan e Mário Elizeu que mesmo na distância sempre me apoiaram durante esse processo acadêmico.

Ao meu noivo Cassiano Silva dos Santos pelo apoio, carinho e compreensão durante a conquista desse título.

Aos meus colegas do laboratório LAEBM que ao longo desses anos dedicados ao desenvolvimento desta pesquisa contribuíram de alguma forma como colaboradores. Em especial à Natália Santos Ferreira e Fernanda Cozendey Anselmo. Aos amigos pesquisadores do laboratório BIOPHAR pela colaboração nessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima, por ter sido o meu primeiro colaborador e orientador nesta instituição ao longo da construção dessa etapa.

À Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior pela oportunidade e financiamento desta conquista.

Enfim, ao inestimável Prof. Dr. José Pereira de Moura Neto, por ter caminhado ao meu lado no decorrer de todo esse processo. Obrigada pela confiança e por acreditar na minha capacidade. Gratidão eterna por todas as orientações, aprendizado e paciência. De forma pessoal, gostaria de agradecer imensamente, por ser meu segundo pai. Por ser presente e me apoiar nos momentos difíceis e me ajudar de forma incondicional durante a concretização desse estudo. Obrigada pela dedicação e apoio. Serei eternamente grata!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mitocôndria.....	16
Figura 2. Etapas da cadeia respiratória.....	18
Figura 3. DNA mitocondrial humano.....	19
Figura 4. Regiões do DNAMt com maior índice de mutações.....	21
Figura 5. Representação da heteroplasmia no DNAMt.....	22
Figura 6. Modelo proposto das ações da enzima GSTM1 no interior da matriz mitocondrial.....	24
Figura 7. Sintomas da MM.....	27

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Principais doenças mitocondriais	25
Quadro 2. Manifestações clínicas das doenças mitocondriais	26
Quadro 3. Primers para amplificação de genes.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatases
arPEO	Oftalmoplegia Externa Progressiva Autossômica Recessiva
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCM	Concentração de Hemoglobina corpuscular médio
CRM	Cadeia Respiratória Mitocondrial
CTE	Cadeia de Transporte de Elétrons
DCRM	Doenças da Cadeia Respiratória Mitocondrial
DHL	Desidrogenase Láctica
DNA_n	Dexorribonucleico Nuclear
DNA_{mt}	Dexorribonucléico Mitocondrial
EDTA	Ácido Etileno Deaminotetracético di-sódico
EGT	Transferência Endossimbiótica de Genes
FADH₂	Flavina adenina dinucleótido reduzida
FBSN	Necrose estriatal bilateral amiliar
GST	Glutationa S-Tranferases
GSTM1	Glutationa S-Tranferases M1
GSTT1	Glutationa S-Tranferases T1
HB	Concentração de Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular médio
HM	Contagem global de hemácias
HT	Hematócrito
LAEBM	Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular
LHON	Neuropatia óptica hereditária de Leber
MELAS	Miopatía mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica, e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral
MERRF	Epilepsia mioclônica e fibras vermelhas irregulares
MM	Miopatía Mitocondrial
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reduzida
NARP	Fraqueza Neurogica, ataxia e retinite pigmentosa
OECP	Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva

OXPHOS	Fosforilação Oxidativa
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PLT	Contagem de plaquetas
Q	Ubiquinona
CoQ10	Coenzima Q10
RCCs	Complexos da Cadeia Respiratória
RDW	Amplitude de distribuição dos eritrócitos
RFLP	Do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
SL	Síndrome de LEIBER
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
SKS	Kearns-Sayre
SP	Síndrome de Person
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VCM	Volume corpuscular médio
VPM	Volume plaquetário médio
WBC	Contagem de Leucócitos

RESUMO

Introdução: A oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP) é uma doença mitocondrial e está associada a alterações no DNA mitocondrial (DNAMt). Os principais fenótipos clínicos da OECP são oftalmoplegia externa, ptose, fraqueza muscular proximal e disfagia progressiva.

Objetivo: Determinar alterações genéticas e marcadores laboratoriais do DNAMt em uma família com pacientes portadores da Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva (OECP).

Metodologia: Um total de 27 voluntários da família, compostos por cinco pacientes da OECP, participaram do estudo. Alterações no DNAMt (região entre as posições 2689 e 4242) foram investigadas pela metodologia de sequenciamento gênico e genótipos para GST por PCR multiplex.

Resultados: Um total de sete mutações pontuais no mtDNA foram encontradas nos três pacientes já diagnósticos com OECP e também em um membro da família. O genótipo nulo da GSTM1 foi encontrado em 16 indivíduos (53,3%), sendo 14 familiares e dois pacientes. Já o genótipo nulo da GSTT1 foi encontrado em apenas um indivíduo. **Conclusão:**

Tendo como base os nossos resultados, conclui-se que a realização do presente estudo e principalmente pela casuística grande (27 familiares), contribuiu para confirmar novas mutações relacionadas a OECP e principalmente estabelecimento precoce de fatores genéticos que possam melhorar o acompanhamento e tratamento dos portadores de miopatia mitocondrial, além de contribuir para o estabelecimento de subfenótipos específicos desta doença. Cumpre ressaltar que este foi o primeiro trabalho na literatura que discorre sobre provável correlação dos genótipos da GSTs com a gravidade clínica em pacientes diagnosticados com a doença mitocondrial OECP.

Palavras-Chave: Doença Mitocondrial, Miopatia, Oftalmoplegia, Genótipo, Fenótipo, Polimorfismo.

ABSTRACT

Objective: To identify genetic changes in mitochondrial DNA (mtDNA) and genotypes of GSTM1 and GSTT1 genes in patients with progressive chronic external ophthalmology (OECF). A total of 27 family volunteers consisting of five OECF patients participated in the study. Alterations in mtDNA were investigated by gene sequencing methodology and genotypes for GSTs by multiplex-PCR. A total of nine mutations have been demonstrated, and none have been described in the current literature. We understand that further studies may relate them to OECF disease. GSTM1 null genotype was found in 16 individuals (53.3%), 14 family members and two patients. GSTT1 null genotype was found in only one individual. The OECF patient with normal GSTM1 has a less severe clinic than those with null GSTM1. We believe that the presence of null GSTM1 directly influences the ability of isoenzymes to reduce oxidative stress in these patients, being a risk factor for the severity and symptoms and early onset of the disease. All mutations found were in heterozygosis, which was expected due to the heteroplasmy normally present in these individuals. Based on our results, we concluded that the present study and mainly the large sample (30 family members) contributed to confirm new OECF-related mutations and especially early establishment of genetic factors that could improve the monitoring and treatment of patients with Myopathy. mitochondrial disease, besides contributing to the establishment of specific subphenotypes of this disease. It is noteworthy that this was the first study in the literature that discusses the probable correlation of GST genotypes with clinical severity in patients diagnosed with mitochondrial OECF disease

Keywords: Mitochondrial Disease, Myopathy, Ophthalmoplegia, Genotype, Phenotype, Polymorphism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 A Mitocôndria.....	16
2.1.1 Cadeia Respiratória	17
2.2 Genoma Mitocondrial	18
2.2.1 Herança Mitocondrial	20
2.2.2 Origem e patogênese das mutações do DNAm	20
2.2.3 Heteroplasmia.....	22
2.2.4 A influência da Glutathione S-Transferase na Miopatia Mitocondrial	23
2.3 Características Gerais da Doença Mitocondrial.....	24
2.3.1 Miopatia Mitocondrial.....	26
2.4 Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva.....	28
2.4.1 Diagnóstico e tratamento da OECP	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Tipo de Estudo	32
4.2 Amostragem.....	32
4.3 População de Referência.....	32
4.4 Critérios de Elegibilidade	33
4.4.1 Critérios de Inclusão.....	33
4.4.2 Critérios de exclusão	33
4.5 Informações Éticas e Financiamento	33
4.6 Amostras	33
4.7 Ensaios Moleculares	34

4.7.1	Extração de ácidos nucleicos	34
4.7.2	Análise molecular das alterações genéticas	34
4.7.2.1	Sequenciamento gênico	34
4.7.2.2	Análise dos Genótipos da Glutathione S-Transferase	36
5.	ANÁLISE DE DADOS	37
6.	RESULTADOS	39
6.1	Artigo	39
7.	CONCLUSÕES FINAIS	61
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
	APÊNDICES	69

1. INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelas citosólicas e a principal fonte de produção de energia para as células. Caracteriza-se por possuir genoma próprio (DNAm_t) e transmissão materna (CRUZ et al., 2018). As doenças causadas por alterações mitocondriais são originadas na disfunção de produção de energia, na fosforilação oxidativa e na manutenção celular. As alterações no DNAm_t geralmente está associada em múltipla variabilidade fenotípica, sendo indeterminada e influenciada principalmente pela taxa de heteroplasmia mitocondrial nos órgãos e ou tecidos afetados (JHONS, 1995; STEFANO et al., 2017; FARRUGGIA et al., 2018).

As doenças mitocondriais também conhecidas por miopatias mitocondriais afetam principalmente órgãos que possuem maior necessidade energética, como os músculos, cérebro e o coração (KIYOMOTO, 1991; SGARBI et al., 2018).

No espectro de manifestações clínicas, as miopatias mitocondriais são de trajetória progressiva na infância até as mais tardias, com sintomas leves a graves, envolvendo múltiplos órgãos. As doenças mais frequentemente descritas são a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), síndrome de Kearns-Sayre (SKS), Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica, e episódios semelhantes a acidente vascular cerebral (MELAS) e a oftalmoplegia externa crônica progressiva (OCEP) (NASSEH et al., 2001; RADELFAHR & KLOPSTOCK, 2018).

A oftalmoplegia externa crônica progressiva é uma das manifestações clínicas mais comuns na miopatia mitocondrial, originalmente descrita e associada às deleções únicas ou múltiplas no DNAm_t. A influência da heteroplasmia é um dos fatores associados à progressão da doença. A clínica principal é a disfunção progressiva e a paralisia dos músculos oculares,

conhecidas como ptose palpebral bilateral superior e envolvimento muscular (RUSSEL & TURNBULL, 2014; AGAMANOLIS, 2017; VISCOMI & ZEVIANI, 2017).

Os fatores determinantes, prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com distúrbios mitocondriais são na maioria desconhecidos. A falta de um marcador laboratorial da doença dificulta o diagnóstico, devido principalmente a condição metabólica bem complexa, o que normalmente impossibilita o entendimento prévio desta patologia. O diagnóstico molecular associado a outros estudos proporciona resultados precoces e com maior fidelidade, oferecendo condições para um tratamento adequado, correto e mais eficaz, permitindo inclusive a busca por novas alternativas no tratamento (MCCLELLAND et al., 2016; BINDU et al., 2018).

Mediante ao exposto, esta pesquisa buscou identificar possíveis alterações genéticas no DNAm envolvidos na doença OECP em uma família com pacientes já diagnosticados, acompanhados e tratados para esta doença.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela de estrutura retorcida responsável pelo fornecimento energético necessário ao metabolismo celular. São as principais estruturas produtoras de energia na forma de Trifosfato de adenosina (ATP) e fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs). Responsáveis também pela manutenção da vida celular, principalmente dos órgãos e tecidos com maior necessidade energética. A mitocôndria é constituída por membrana externa, espaço de crista, membrana interna, espaço intermembranar e espaço da matriz, conforme mostra a figura 1 (MARGUILIS, 2001; XIE et al., 2018).

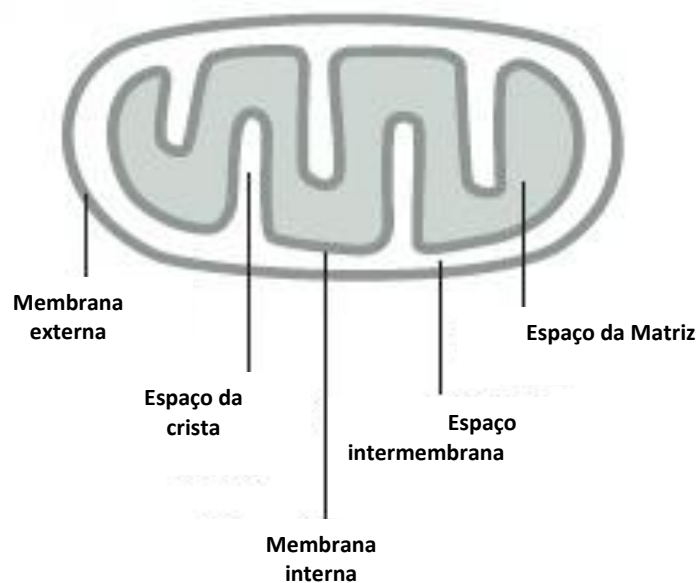


Figura 1 – Estrutura mitocondrial. **Fonte:** Adaptado de Albets (2004)

Compreende-se que durante o processo evolutivo, as mitocôndrias perderam gradualmente a maior parte de seu genoma, ocasionando na redução significativa do tamanho de sua informação genética, ocorrida talvez por transferência genética, perda e ou

translocação de genes mitocondriais para o genoma nuclear celular (MARTIN et al., 2013; VAN ESVELD & HUYNEN, 2018).

As estruturas mitocôndriais são indispensáveis para o metabolismo energético e importantes sítios catalíticos para o funcionamento das fases oxidativas da respiração celular. A biogênese mitocondrial é intimamente dependente da expressão coordenada tanto do genoma nuclear como mitocondrial, necessária para que a montagem e a função dos complexos respiratórios produzam a maior parte da energia requerida pelas células (KLUG et al., 2010; LEE et al., 2018).

2.1.1 Cadeia Respiratória

A cadeia respiratória depende de uma adequada síntese, transporte e montagem de proteínas e cofatores para a cadeia de transporte de elétrons (CTE). Todas estas funções são sustentadas pela atividade de complexos proteicos que constituem o sistema de fosforilação oxidativa (SENA & CHANDEL, 2012; COGLIATI et al., 2018).

A organela mitocondrial participa também de outros processos da manutenção e sinalização intracelular, apoptose e nas transformações metabólicas dos aminoácidos, lípidos e colesterol. Entretanto sua maior particularidade está no metabolismo energético pela beta oxidação dos ácidos graxos, ciclo da uréia e processo final da produção de ATP (FRIEDMAN & NUNNARI, 2014).

A cadeia respiratória mostrada na figura 2 é formada por cinco principais agrupamentos: Complexo I (NADH ubiquinona oxidoreductase, CI), complexo II (succinato-quinona oxidoreductase, CII), Complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidoreductase, complexo citocromo bc1, CIII), e Complexo IV (citocromo c oxidase, CIV). Estes se unem para o transporte de elétrons pelo bombeamento de prótons (ACIN-PEREZ & ENRIQUEZ, 2014; ENRIQUEZ, 2016).

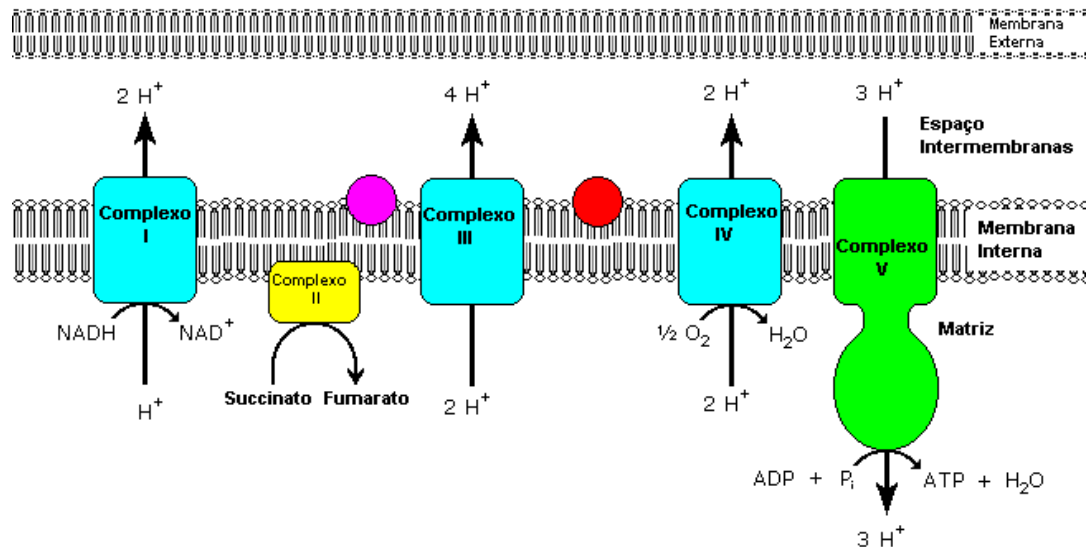


Figura 2 - Etapas da cadeia respiratória. **Fonte:** Adaptado de <https://www.researchgate.net>. Acesso: 01/01/2018

Na cadeia respiratória a coenzima Q10 (CoQ10) atua como antioxidante intracelular que impede senescência e disfunção causadas pelo estresse oxidativo. É um cofator essencial no transporte de elétrons e o único antioxidante lipofílico sintetizado endogenamente (DALLNER & SINDELAR, 2000; DEROSA et al., 2019).

2.2 Genoma Mitocondrial

Desde a descoberta do DNAmT em 1963, foi constatado que seus genes codificam proteínas remanescentes à cadeia respiratória mitocondrial. Altamente compactado, o genoma mitocondrial e sua expressão são essenciais para a sobrevivência, desenvolvimento e produção de energia de diversos organismos (SOUZA, 2005; LEE et al., 2018).

O número de moléculas de DNAm_t varia entre 100 a 1000 na célula, e esse número reflete o potencial de necessidade energética celular. Ao contrário do DNA nuclear (DNAn) que tem uma organização diplóide nas células somáticas e haplóide em gametas, o DNAm_t está presente em várias cópias dentro das mitocôndrias de cada célula (LEGATI et al., 2016; WACHSMUTH et al., 2016).

O genoma mitocondrial humano compreende exatamente a 16.569 pares de bases, codificando 37 genes, correspondente a 13 polipeptídios, 2 moléculas de rRNA e 22 tipos de tRNA. Também possui uma região não codificante, conhecida como *D-Loop* com aproximadamente 1122 pares de bases, classificada em regiões chamadas de hipervariáveis I, II e III, com papel de promover a regulação da replicação e transcrição de todo o DNAm_t (ANDERSON et al., 1981; EI HATTAB et al., 2017; YAO et al., 2019) (Figura 3).

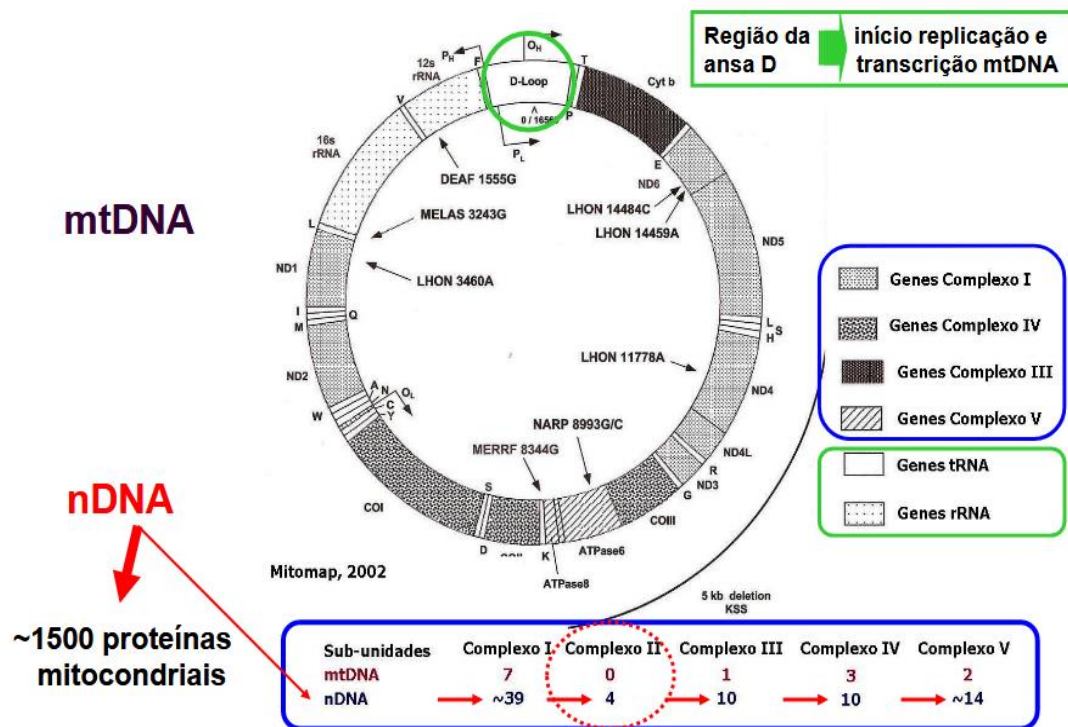


Figura 3 - DNA mitocondrial humano. Fonte: Adaptado de Dimauro & Schon (2002)

A diminuição do número de genes codificados pelo mtDNA ao longo da evolução tem sido postulada como sendo uma estratégia para otimizar recursos celulares e economia de

energia. Curiosamente, estudos filogenéticos sugerem que um passo alternativo na evolução mitocondrial refere-se ao desenvolvimento de organelas derivadas de mitocôndrias sem DNAm em eucariotos (WILLIAMS & KEELING, 2003; BURGER & VALACH, 2016).

2.2.1 Herança Mitocondrial

Desde a sua descoberta, é postulado que a herança mitocondrial ocorre praticamente de origem materna. Atualmente já descrevem que esta herança é cerca de 1.000 vezes menor nos espermatozóides do que os do oócito. Além disso, no processo de fecundação, ocorrem mecanismos seletivos que visam a destruição do DNAm paterno (NASS & NASS, 1963; SUTOVSKY et al., 1999), conhecida como mitofagia, processo pelo qual as células digerem suas próprias mitocôndrias, desempenhando papel fundamental na eliminação seletiva das mitocôndrias paternas (SAGER & LANE, 1972; WILLIAMS, 2018).

Além disso, alguns autores sugerem que exista um gene de DNAn, ainda não identificado, que esteja envolvido na eliminação de mitocôndrias paternas (GYLLENSTEN et al., 1991; TAYLOR, 2003; ALEXANDER et al., 2015; KANG et al., 2016; LUO et al., 2018).

2.2.2 Origem e patogênese das mutações do DNAm

Mutações genéticas fazem com que as mitocôndrias não produzam energia suficiente para células e órgãos (SOUZA et al., 2005; COLLEEN et al., 2017). Atualmente, são descritas mais de 100 mutações no DNAm e cerca de 20 no DNAn relacionadas a patologias mitocondriais que comprometem a função oxidativa e causam diferentes tipos de doenças (DI MAURO & SCHON, 2003; TUPPEN & TAYLOR, 2010; GORMAM et al., 2016; AHUJA, 2018).

As características das doenças mitocondriais e associação com mutações mais comuns estão descritas na figura 4. A doença oftalmoplegia externa crônica progressiva é considerada de clínica menos severa, enquanto as mais graves são: SL - síndrome de Leigh, MELAS - miopatia, encefalopatia, acidose láctica, episódios de acidente vascular cerebral, MERRF - epilepsia mioclônica e fibras vermelhas irregulares, NARP - fraqueza neurológica, ataxia e retinite pigmentosa, SP - síndrome de Pearson (TUPPEN & TAYLOR, 2010; RUSSEL & TURNBULL, 2014).

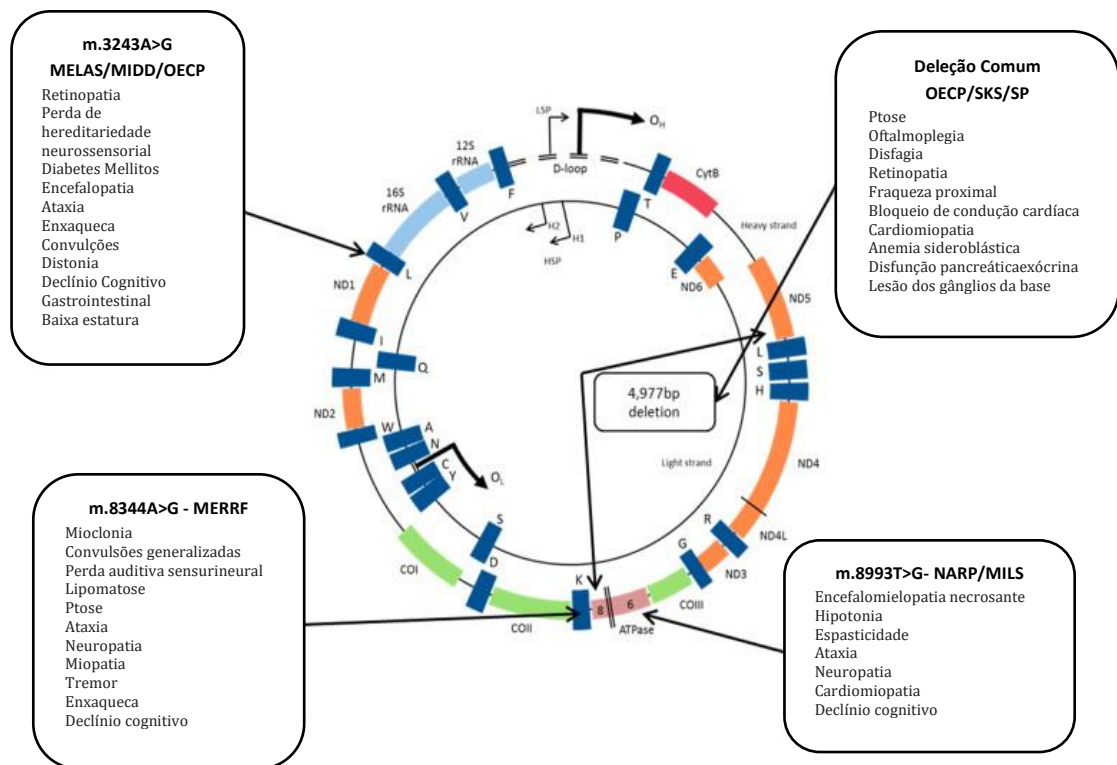


Figura 4 - Regiões do DNAm com maior índice de mutações. **Fonte:** Adaptado por Russel & Turnbull (2014)

Muitos casos de OECP (40 a 70%) resulta de uma única deleção no DNA mitocondrial, que varia de 1,3 a 9,1 kilobases (Kb) de comprimento, mas pode diferir em sua localização. A deleção no DNAm relativamente associada a OECP, possui 4,9 Kb de

comprimento e possui pontos de interrupção nos nucleotídeos 8470 e 13.460. A maioria dos casos de OECP ocorre como uma condição esporádica, embora uma pequena percentagem tenha sido considerada hereditária (MORAES et al., 1989; CRUZ et al., 2017).

2.2.3 Heteroplasmia

Apesar das numerosas cópias do DNAm_t em cada mitocôndria, em muitos casos as mutações ocorrem apenas em algumas cópias, levando a um agrupamento variado e normal de DNAm_t. Isso é muito importante porque essa taxa de mutação se correlaciona com a gravidade da doença mitocondrial. (WHITE et al.,1999; NUSSBAUM & WILLARD, 2015; SOINI, 2016).

Este processo de segregação aleatória, ocorre após a divisão celular levando ao que chamamos de heteroplasmia demonstrado na figura 5 (AGAMANOLIS, 2017).

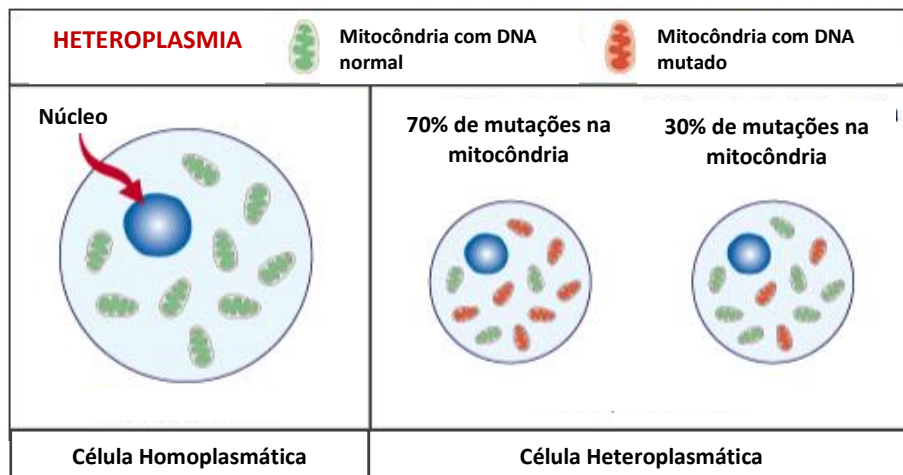


Figura 5 – Representação da heteroplasmia no DNAm_t. **Fonte:** adaptado de <https://pt.quora.com/search?q=heteroplasmic>. Acesso: 20/11/2018

Devido a heteroplasmia mitocondrial, indivíduos com distúrbios mitocondriais podem apresentar uma grande variedade de sintomas. Portanto, ao contrário de defeitos genéticos nucleares que estão presentes dentro de cada célula, a quantidade de DNAm_t mutante varia de

célula para célula e de órgão para órgão. Esta complexidade fornece uma explicação para a diversidade de doenças do DNAm (SOUZA et al., 2005; STEFANO et al., 2017).

2.2.4 A influência da Glutathione S-Transferase na Miopatia Mitocondrial

As glutathionas S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas multifuncionais envolvidas no metabolismo de uma variedade de compostos xenobióticos, incluindo carcinógenos mamários, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, possuindo a capacidade de detoxificar o produto reativo do metabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, impedindo, assim, ação de toxinas endógenas e exógenas que podem causar algum dano na célula, incluindo danos até nos DNAs nucleares e mitocondrial (HAYES & PULFORD, 1995; MIAO, 2019).

A deleção em homozigose do gene GSTM1 ocorre entre 20 e 70% nas diferentes populações mundiais, enquanto que para o gene GSTT1 esta variação se distribui entre 11 e 38% (ARRUDA et al., 1998; BUFALO et al., 2006; BID et al., 2010).

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que indivíduos com deleção na GST apresentam risco elevado de desenvolver vários tipos de neoplasias, incluindo câncer de bexiga, cólon, pulmão, pele e estômago (GOLONI-BERTOLLO et al., 2006; MASOOD et al., 2013; SHRIDHAR et al., 2016).

O genótipo nulo da GSTM1 está envolvido na elevação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros agentes cancerígenos, portanto, mais suscetíveis a danos ao DNA. Já o genótipo nulo da GSTT1 é observado frequentemente em leucopenias, leucemias e câncer de esôfago e pulmão (RAMOS et al., 2017; PLJESA-ERCEGOVAC et al., 2018; RITAMBHARA et al., 2019).

O sistema biológico de atuação da enzima GSTM1 (Figura 6) pode produzir um dos mais importantes mecanismos endógenos de detoxificação para cadeia respiratória. Nesse processo são gerados grandes níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a redução de O₂, o que pode ocasionar peroxidação lipídica, principalmente sobre as lipoproteínas da membrana de organelas e até celular. A ação de EROs no interior da célula pode produzir lesões em diferentes compostos, como lipídios, proteínas e inclusive danificar DNA nuclear e mitocondrial (PAVICIC et al., 2009; LI et al., 2016).

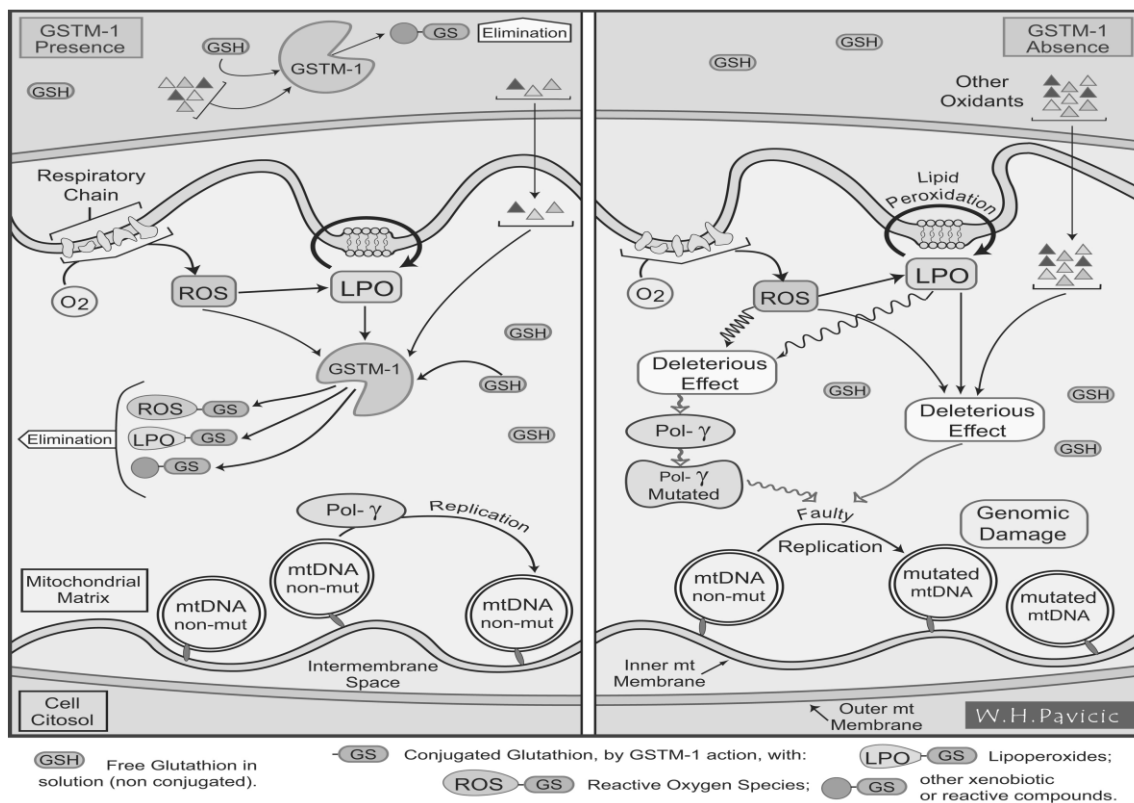


Figura 6 - Modelo proposto das ações da enzima GSTM-1 no interior da matrix mitocondrial. **Fonte:** Pavicic et al., 2009.

2.3 Características Gerais da Doença Mitocondrial

Os avanços de pesquisas em doenças genéticas contribuíram significativamente para identificação de inúmeras mutações ligadas a processos oxidativos e associados às doenças mitocondriais (JACKSON et al., 2018).

A disfunção mitocondrial envolve uma variedade de condições, incluindo desde de doenças simples a câncer e doenças neurodegenerativas. Assim, os tecidos que mais necessitam de ATP (sistema nervoso central, músculos esqueléticos e cardíacos, rins e fígado) são mais afetados por deficiências na fosforilação oxidativa (JHONS, 1995; NUNNARI & SUOMALAINEN, 2012; FARRUGGIA et al. ,2018).

As doenças mitocondriais (Quadro 1) surgem e são classificadas quanto ao aparecimento esporádico (por rearranjos, duplicações ou deleções), herança materna (tipicamente por mutações de ponto) ou herança mendeliana (tipicamente por defeitos do DNA nuclear) (NASSEH et al., 2001).

Quadro 1: Principais doenças mitocondriais (Adaptado de NASSEH et al., 2001)

Doenças Mitocondriais	Características Clínicas
Melas	Convulsão, Encefalopatia, Diabetes Mellitus, surdez, baixa estatura, cardiomiopatia e deficiência psicomotora
SKS	Demência, encefalopatia, surdez bilateral, ataxia, condução cardíaca, oftalmoplegia externa, ptose, fraqueza muscular, debilidade endócrina, retinose pigmentar, síncope e disfunção do sistema Nervoso Central
LHON	Princípio de AVC e comprometimento visual aguda e subaguda na 1ª e 2ª geração
OECP	Miopatia proximal e ptose
LEIGH	Hipotonia, distonia, crises convulsivas, atrofia óptica, retinose pigmentar, distúrbio no movimento dos olhos, hipo/hiper-reflexia e debilidade psicomotora
MERRF	Retinose pigmentar, ataxia, demência, surdez, baixa estatura, cardiomiopatia, oftalmoplegia externa, epilepsia mioclônica, lipomas múltiplos e Miopatia
PEARSON	Insuficiência hepática na infância, epilepsia e retardo psicomotor

Em meio a complexidade da doença mitocondrial, estudos têm relatados aproximadamente 1/1000 crianças com alguma deficiência auditiva severa ou profunda ao

nascimento ou na infância devido a herança autossômica recessiva (75%-85%), dominante (12-13%) e ligada ao X ou mitocondrial em cerca de 3% dos casos (PLATTO et al., 2005; SCARPELLI et al., 2012; SHIN-ICHI USAMI & SHIN-YA NISHIO, 2018).

Estas doenças são diagnosticadas primeiramente através da apresentação clínica, como intolerância ao exercício com debilidade em repouso, alterações no sistema nervoso central com miopatia associada, oftalmoplegia progressiva e alguns exames complementares como biópsia do músculo (MCCLELLAND et al., 2016) (Quadro 2).

Quadro 2: Manifestações clínicas das doenças mitocondriais (Adaptado de MCCLELLAND et al., 2016)

TECIDOS	SINAIS E SINTOMAS
Sistema Nervoso Central	Ataxia, convulsões, distonia, perda auditiva, retardo psicomotor, enxaqueca
Nervos Periféricos	Neuropatia periférica
Muscular	Oftalmoplegia, ptose e intolerância ao exercício
Hematológico	Anemia sideroblástica
Endócrino	Baixa estatura, hipoparotiroidismo e <i>Diabetes Mellitos</i>
Oftalmológico	Atrofia óptica e catarata
Cardíaco	Bloqueio de condução e cardiomiopatia
Gastrointestinal	Disfunção pancreática e falsa obstrução intestinal
Laboratorial	Acidose láctica
Renal	Síndrome de Fanconi

2.3.1 Miopatia Mitocondrial

Miopatia mitocondrial (MM) é o comprometimento muscular causado por defeitos de produção de ATP, tornando o metabolismo energético oxidativo reduzido, levando à

expressão de fenótipos patológicos e afetando os músculos esqueléticos (LARSSON et al., 1995; GORMAM et al., 2016).

Na Miopatia manifesta-se diversos fenótipos clínicos com algumas similares à outras miopatias e outras com ardiomiopatia, epilepsia ou episódios de acidente vascular cerebral, entre outros (Figura 7) (GORMAM et al., 2016).

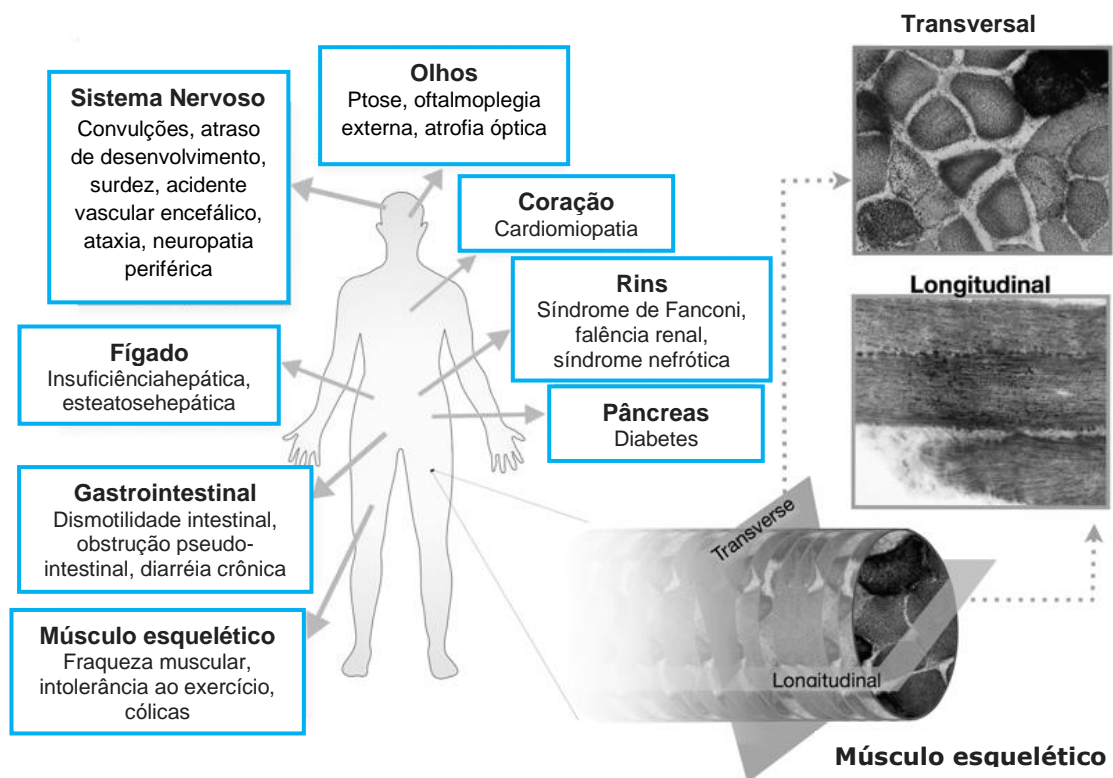


Figura 7 - Sintomas da MM e biópsias do músculo esquelético. **Fonte:** Adaptado por GORMAN et al., 2016

Os sintomas mais visíveis são fraqueza muscular, especialmente nos braços e pernas, atrofia muscular e intolerância ao exercício. Quando submetido a atividades físicas, um maior grau de exaustão ao esforço físico (Associação de Distrofia Muscular (MDA, 2018).

2.4 Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva

Na doença OECP, as regiões dos músculos oculares estão sempre comprometidas, todavia, muitos outros órgãos também podem ser afetados, como cérebro e músculos esqueléticos (CABALLERO et al., 2007; ROPPER et al., 2009; RAMAKRISHNAN et al., 2015; BHATTI et al., 2017).

Nesta patologia, os sintomas mais comuns são ptose superior progressiva, ptose simétrica bilateral, oftalmoplegia, fraqueza muscular proximal e disfagia progressiva, resultando em paralisia progressivamente lenta dos músculos extra-oculares. As particularidades são desenvolvidas isoladamente ou em associação com outras patologias mitocondriais (SWIFT & SING, 1988; CARLOW et al., 1998; YU-WAI-MAN et al., 2013; PFEFFER et al., 2014; HEIGHTON et al., 2019).

As primeiras manifestações na OECP começam na infância ou adolescência e progridem lentamente na idade adulta. Os primeiros sintomas aparecem nos músculos extra-oculares, atingindo progressivamente regiões mais próximas, como os músculos da expressão facial (KIYOMOTO et al., 1991; KOKA & PATEL, 2019).

Além dos sintomas descritos, ocorre fraqueza nos músculos do braço, perna e pescoço, intolerância ao exercício, disfagia, ataxia, perda de peso e perda auditiva neurosensorial. Manifestação de sintomas adicionais de comprometimento psicológico, como transtorno do pânico, depressão e ansiedade (Genetics Home Reference, 2019).

2.4.1 Diagnóstico e tratamento da OECP

Na avaliação clínica, a ptose associada à OECP ocorre devido ao trauma direto ou indireto do músculo elevador. Nesta condição, a doença piora e manifesta incorreções da

motilidade ocular. O formato dos olhos, juntamente com a posição das pálpebras e sobrancelhas, tornam-se progressivamente disformes (PFEIFFER, 2018; KOKA & PATEL, 2019).

Por ser uma doença rara, a OECP é de difícil diagnóstico devido à sua grande heterogeneidade genética e ausência de um marcador padrão para a doença. Vários estudos clínicos, de imagem e funcionais, histopatológicos, bioquímicos e até moleculares são necessários para determinar o diagnóstico fidedigno e específico da doença. Essas avaliações são complexas e precisam ser realizadas por equipes multidisciplinares organizadas, por meio de análise comparativa e seguidas na tentativa de obter um diagnóstico específico (CHEN et al., 2014; MCCLELLAND et al., 2016).

A coenzima Q10 (CoQ10, ubiquinona) desempenha um papel importante no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. O tratamento com suplementos alimentares com composição de CoQ10 é recomendado essencialmente devido à diminuição dos níveis circulantes de CoQ10 na doença (TURI et al., 2012; TAVARES, 2015; JAFARI et al., 2018).

A vitamina B12 (cobalamina) desempenha um papel importante no metabolismo celular, principalmente na síntese de DNA, metilação e metabolismo mitocondrial. Sua deficiência afeta a fosforilação oxidativa mitocondrial, reduzindo a função das mitocôndrias no nervo óptico. O uso da vitamina B12 na OECP têm contribuído para o funcionamento do metabolismo deficiente e melhorado a qualidade de vida dos pacientes (GONZÁLEZ QUEVEDO et al., 2010; VERDE et al., 2017).

Sendo uma doença de curso progressivo, alguns medicamentos são indicados para tratamento psicológico. A Domperidona é comumente utilizada devido a náuseas e vômitos que são frequentes. Devido o sistema neurológico estar frequentemente afetado na doença mitocondrial, antidepressivos como amitriptilina, nortriptilina e gabapentina são utilizados nesses casos (HIRANO, 2016).

Abordagens terapêuticas como fisioterapia, fonoaudiologia ou fisioterapia respiratória podem ser necessárias em pacientes com doença mitocondrial. Mesmo que essas intervenções não revertam o processo patológico, elas podem ajudar na qualidade de vida dos pacientes (United Mitochondrial Disease Foundation, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Encontrar alterações genéticas no DNA mitocondrial em uma família com pacientes portadores da Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva.

3.2 Específicos

- Coletar dados demográficos e clínicos de cada membro da família;
- Encontrar possíveis mutações específicas para miopatia mitocondrial em cada membro da família;
- Identificar os genótipos das GSTM1 e GSTT1 na família e gravidade da doença.
- Estimar a patogênicidade das mutações específicas encontradas com a clínica de cada membro da família.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de Estudo

Esta pesquisa baseou-se em um modelo descritivo de estudo familiar de pacientes diagnosticados com a doença Oftalmoplegia Externa Progressiva descrita como uma Miopatia Mitocondrial.

4.2 Amostragem

Uma família com cinco (05) irmãos diagnosticados com doença mitocondrial OECP foi convidada para participar do estudo com inclusão de 27 voluntários dessa família variando entre 3 a 60 anos de idade. As etapas do estudo foram realizadas no Laboratório de Análises Especializadas em hematologia e Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

4.3 População de Referência

Não houve seleção ou divisão de grupos. Por se tratar de um estudo relacionado a uma doença genética, todos os membros da família foram convidados para participar da pesquisa, incluindo maridos/esposas de parentes da família.

A família estudada foi composta por cinco portadores que apresentaram o quadro clínico de Miopatia Mitocondrial realizado por teste clínico e enzimático confirmando assim o diagnóstico da doença PEOB1 (Oftalmoplegia Externa Progressiva Autossômica Recessiva 1 (arPEO). Contudo, dois (02) falecidos e não foi possível realizar análises moleculares, com somente dados dos prontuários médicos coletados.

4.4 Critérios de Elegibilidade

4.4.1 Critérios de Inclusão

De acordo com a proposta da pesquisa todos os membros da família voluntariados foram inclusos. Tanto os que já haviam sido diagnosticados com a Oftalmoplegia Externa Progressiva como também os demais que tivessem determinado grau de parentesco.

4.4.2 Critérios de exclusão

Não houve exclusão de nenhum membro da família.

4.5 Informações Éticas e Financiamento

As amostras utilizadas na pesquisa foram protocoladas e obtidas por meio do projeto **“INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL EM PACIENTES COM MIOPATIA MITOCONDRIAL”**, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas com o número de CAEE: 13495819.0.3001.5613 (anexo).

Este projeto recebeu recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), assim como recursos próprios e de projetos ao qual este Programa de Pós-Graduação se inclui.

4.6 Amostras

As amostras de sangue foram coletadas por profissional habilitado, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram coletados a vácuo cinco mililitros de sangue venoso em EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico).

Todas as coletas e entrevistas foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para procedimentos de análises moleculares.

4.7 Ensaios Moleculares

4.7.1 Extração de ácidos nucleicos

Para investigação molecular realizou-se a extração do DNA do *pellet* de leucócitos utilizando-se o método de TRIzol®, onde também separou-se o RNA para análises futuras.

O *pellet* de Leucócitos foi obtido transferindo 2,5 mL do sangue total com EDTA para um tubo Falcon de 15mL. Adicionou-se 10mL de Solução A (Tris.HCl pH7,6 1M - MgCl₂ 0,5M - NaCl 5M) vortexado até homogeneizar. Centrifugou-se por 10 min a 1000 RPM e dispensado o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 5mL de Solução A e repetido por mais 3 vezes. Foi obtido então somente as células brancas (pellet) a qual foi ressuspendido em 500 µL da Solução A e transferido para microtubos de 1,5mL. Centrifugou-se por 10 min a 12.000 RPM e descartado o sobrenadante. As células brancas assim preparadas foram então armazenadas em -80°C até o momento da extração do material genético.

4.7.2 Análise molecular das alterações genéticas

4.7.2.1 Sequenciamento gênico

O sequenciamento foi realizado visando identificar possíveis mutações entre as regiões 2689 e 4242 pares de bases do DNAm (Primers Direto: CGTGAAGAGGCGGGCATAAC e Reverso : GCTAAGGTCGGGGCGGTGAT (Posição entre 2689-3520 pb) e Primers Direto TCCTAATGCTTACCGAACGA e Reverso AGGTTTGAGGGGGAATGCTG (Posição

entre 3362 e 4242 pb). Esta Região foi escolhida por ocorrer nela mais de 70% de todas mutações já descritas para OECP.

Os produtos amplificados foram então purificados para realização do sequenciamento gênico, com a metodologia *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher)*.

A técnica molecular empregada para o sequenciamento gênico foi o de SANGER (SANGER et al., 1977). Para esta metodologia, foi utilizado Sequenciador Automático Applied Biosystems™ 3500, utilizando-se o *Kit BigDye 03 TM (Terminator Sequencing Standard- Applied Biosystems)*.

A reação de sequenciamento foi realizada em placas de fundo em V (*MicroAmp 96-well Reaction Plate - Applied Biosystems*), utilizando-se 2,0 µl de Big Dye Terminator, 2 µl de primer (1,5 pmol), 2 µl de tampão (Tris-Cl 200mM pH 9,0: 5 mM MgCl₂), 200 ng da PCR purificada e 5,6 µl de H₂O (Ultra Pura – GIBCO, Invitrogen, CA) em um total de 10 µl. As reações foram incubadas em termociclador (BIORAD T100® gradient), na temperatura inicial de 96°C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 96°C por 45 segundos; 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Para cada poço contendo 10 µl de reação foram adicionados 8 µl de H₂O milli-Q autoclavada e 32 µl de etanol a 100% e homogeneizados 40 vezes por inversão. Após homogeneização, a reação foi incubada por 20 minutos no escuro a temperatura ambiente, centrifugadas por 45 minutos a 2500 xg a temperatura ambiente, descartando-se o sobrenadante em papel absorvente e realizando-se spin invertido a 120 xg. Após a centrifugação, foram adicionados 150 µl de etanol a 70% e homogeneizada por 40 vezes, com centrifugação por 15 minutos a 2500 xg à temperatura ambiente, sendo esta etapa repetida 3 vezes.

As amostras obtidas foram incubadas em ambiente escuro por período mínimo de 2 horas, após as quais acrescentou-se 10 µl de *Hi-Di™ Formamide*(*Applied Biosystems*) e encaminhadas para serem sequenciadas.

4.7.2.2 Análise dos Genótipos da Glutathione S-Transferase

Os genótipos da GSTM1 e GSTT1 foram caracterizados pela metodologia da PCR Multiplex, utilizando o gene da β-globina como controle interno da reação (MOURA NETO et al., 2009, GONÇALVES et al., 2010). Para cada reação molecular, foram incluídos controles negativos e positivos para sua validação.

Nessa técnica, três pares de primers específicos para a amplificação de diferentes alvos foram incluídos na mesma reação.

Quadro 3: Primers para amplificação dos genes.

Primers	Sequências -5'-3'	Produto amplificado
β-globina direto	GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC	700pb
β-globina reverso	CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT	
GSTM1 direto	CTGCCCTACTTGATTGATGGG	271pb
GSTM1 reverso	CTGGATTGTAGCAGATCATGC	
GSTT1 direto	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC	480pb
GSTT1 reverso	TCACCGGATCATGGCCAGCA	

pb: pares de bases.

A PCR multiplex foi realizada em uma reação de 50µl de volume final contendo 5µl de DNA genômico, 1X tampão PCR, 2,5µl de MgCl₂, 2,0µl de dNTP, 0,15µl de cada primer e 0,4U Taq polimerase. O protocolo de PCR consistiu em uma desnaturação inicial de 45s a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45s, anelamento a 58°C por 45 s, alongamento a 72°C por 1 min 30s, e uma etapa final de alongamento a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR multiplex foram separados por eletroforese em brometo de etídio no gel de agarose a 1% corado com brometo a 100 V, 200mA por 30 min e visualizado em equipamento de detecção ultravioleta fotodocumentador GDS-1302 (ENDURO™ GDS).

5. Análise de Dados

Os dados foram compilados nos programas estatístico SPSS v19 (CDC, Atlanta, Geórgia). A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de D'Agostino e Pearson.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (X²), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Na análise de apenas dois grupos categóricos, as análises serão realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência serão calculados para essas variáveis. O nível de significância estatística será de $p < 0,05$.

6. Edição e Alinhamento das Sequências.

Para análise manual dos eletroferogramas obtidos foi utilizado o programa DNASTAR Lasergene 7 (DNASTAR, EUA), pela metodologia SeqMan, com a geração de uma sequência normal ou consenso. Estas sequências de cada amostra foram alinhadas no

programa Megalign com sequência de referência. O alinhamento foi salvo em formato FASTA.

6. RESULTADOS

6.1 Artigo

Artigo a ser submetido a **Mitochondrion Journal**



ISSN: 1567-7249

[Submit Your Paper](#)

[Supports Open Access](#)

[View Articles](#)

[Guide for Authors](#) ▼

[Abstracting/ Indexing](#)

[Track Your Paper](#) ▼

[Order Journal](#) ▼

Journal Metrics

[CiteScore: 3.48](#) Ⓞ

Impact Factor: **3.449** Ⓞ

5-Year Impact Factor: **3.771** Ⓞ

Source Normalized Impact per Paper (SNIP): **0.832** Ⓞ

SCImago Journal Rank (SJR): **1.453** Ⓞ

Mitochondrion

Official Journal of the [Mitochondria Research Society](#)

Editor-in-Chief: Keshav K. Singh

[View Editorial Board](#)

Covered by MEDLINE®

Affiliated with the [Japanese Society of Mitochondria Research and Medicine](#)

Mitochondrion is a definitive, high profile, peer-reviewed international research journal. The scope of *Mitochondrion* is broad, reporting on basic science of mitochondria from all organisms and from basic research to pathology and clinical aspects of mitochondrial diseases. The journal welcomes original...

[Read more](#)

[Most Downloaded](#) [Recent Articles](#) [Most Cited](#) [Open Access Articles](#)

[Metabolic features of the cell danger response](#) - [Open access](#)

Robert K. Naviaux

[Metabolic features and regulation of the healing cycle—A new model for chronic disease pathogenesis and treatment](#) - [Open access](#)

Robert K. Naviaux

[Perspective: Cell danger response Biology—The new science that connects environmental health with mitochondria and the rising tide of chronic illness](#) - [Open access](#)

Robert K. Naviaux

[View All Most Downloaded Articles](#)

Find out why your peers publish in PRA TAKE ME TO THE INTERVIEW   **Read Prof. Miriam Greenberg's**

RESUMO

Objetivo: Identificar alterações genéticas no DNA mitocondrial (DNAm_t) e genótipos dos genes GSTM1 e GSTT1 em portadores de oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP). Um total de 27 voluntários de uma família constituídos por cinco portadores de OECP participaram do estudo. Alterações no DNAm_t foi investigada pela metodologia de sequenciamento gênico e os genótipos para a GSTs pela multiplex-PCR. Um total de nove mutações foram demonstradas, e nenhuma foi descrita na literatura atual. Entende-se que estudos posteriores poderão relacioná-las com a doença OECP. O genótipo nulo da GSTM1 foi encontrado em 16 indivíduos (53,3%), sendo 14 familiares e dois pacientes. Já o genótipo nulo da GSTT1 foi encontrado em apenas um indivíduo. A paciente da OECP com GSTM1 normal possui clínica menos grave daqueles com GSTM1 nulos. Acreditamos que a presença da GSTM1 nulo influencia diretamente a capacidade das isoenzimas de reduzir o estresse oxidativo nestes pacientes, sendo um fator de risco para a gravidade e sintomas e início precoce da doença. Todas as mutações encontradas foram em heterozigose, o que já era esperado devido a heteroplasmia presente normalmente nestes indivíduos. Tendo como base os resultados, conclui-se que a realização do presente estudo e principalmente pela casuística grande (27 familiares), contribuiu para confirmar novas mutações relacionadas a OECP e principalmente estabelecimento precoce de fatores genéticos que possam melhorar o acompanhamento e tratamento dos portadores de Miopatia mitocondrial, além de contribuir para o estabelecimento de subfenótipos específicos desta doença. Cumpre ressaltar que este foi o primeiro trabalho na literatura que discorre sobre provável correlação dos genótipos da GSTs com a gravidade clínica em pacientes diagnosticados com a doença mitocondrial OECP.

INTRODUÇÃO

A mitocôndria é uma organela celular responsável pelo suprimento de energia necessário ao metabolismo. São as principais estruturas produtoras de energia (ATP) e a fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio. Responsável pela manutenção da vida celular, principalmente de órgãos e tecidos com maior necessidade energética (MARGUILIS, 2001; XIE et al., 2018).

Os distúrbios mitocondriais são um grupo de condições complexas causados por disfunções na cadeia respiratória. Tais características apresentam padrão fenotípico e genético heterogêneo. A oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP) é uma das manifestações mais comuns da doença mitocondrial. O fenótipo clínico OECP foi previamente estabelecido e é caracterizado por oftalmoplegia externa, ptose, fraqueza muscular proximal e disfagia progressiva (SMITS et al., 2011; PFEFFER et al., 2014; MELO & VILARINHO, 2017; HEIGHTON et al., 2019).

Na maioria dos casos de OECP (40-70%) resulta de uma única exclusão de DNA mitocondrial heteroplásmico, essas deleções têm um comprimento de 1,3 a 9,1 kilobases (Kb), mas podem diferir na localização. A exclusão relativamente comum de DNAm_t associada à OECP tem 4,9 Kb de comprimento (AGOSTINO et al., 2003 ; LEE & BRAZIS, 2002 ; MORAES et al., 1989; MOSLEMI et al., 1996; CRUZ et al., 2017)

Irregularidades recorrentes de mutações no genoma mitocondrial podem caracterizar a manifestação clínica da miopatia mitocondrial para a doença OECP e, dependendo da variedade genotípica, a gravidade da doença pode afetar apenas um

tecido ou vários sistemas (GLUTS et al., 1998; GRIFFIN & SMITH, 2000; DUNNEN & ANTONARAKIS, 2000; COLLEEN et al., 2017).

Durante o processo oxidativo, as GSTs (GSTM1 e GSTT1) atuam como catalisadores para detoxicação de oxigênio ativo e produtos de peroxidação lipídica. A exclusão dos genótipos GSTM1 e GSTT1 causam principalmente dano oxidativo do ERO na matriz mitocondrial (UZUNO-GLU et al., 2006; PINHEL et al., 2008; GHORBEL et al., 2017). Os efeitos das enzimas GSTM1 e GSTT1 na matriz atuam como um fator de proteção para o mtDNA. Pois na via metabólica do GSTM1 ocorre a eliminação de espécies reativas e o bloqueio do efeito deletério (PAVICIC et al., 2009). No entanto, poucos estudos sobre a correlação de genótipos de GSTs (GSTM1 e GSTT1) com doença mitocondrial da OECP são conhecidos.

Nesta pesquisa 27 voluntários de uma família incluindo nessa amostragem três portadores da doença OECP foram avaliados geneticamente. Indivíduos com OECP possivelmente apresentam o sistema biológico comprometido, resultantes de disfunções no DNAm. Como é conhecido as Glutathione S-Transferases (GSTM1 e GSTT1) atuam nas vias metabólicas como detoxicantes e catalizadores endógenos de radicais livres. Diante do exposto foi realizada uma correlação para determinar a progressão e gravidade da doença mitocondrial OECP nos pacientes e voluntários com polimorfismos GSTs (GSTM1 e GSTT1).

Sabendo que os polimorfismos GSTs têm sido alvo de diversos estudos de prevalência e associação como risco para várias doenças metabólicas. Nesta pesquisa a deleção de genótipo GST (GSTM1) foi a mais frequente entre os indivíduos investigados. Sendo assim, foi possível presumir que a GSTM1 nula pode influenciar na

clínica precoce ou na gravidade e progressão da doença em indivíduos portadores de OECP.

PACIENTES, VOLUNTÁRIOS E MÉTODOS

Amostragem

Uma família com cinco irmãos, todos nascidos na cidade de Manaus, diagnosticados com doença mitocondrial OECP foi convidada para participar do estudo. Destes, apenas três pacientes participaram do estudo, uma vez que dois já são falecidos. Um total de 30 coletas foram então realizadas, sendo 27 parentes voluntários e os três portadores de OECP. Todas as coletas de sangue, entrevistas, preenchimento do questionário com dados demográficos, explicação, assinatura do TCLE e extração do material genético foram realizadas no Laboratório de Análises Especializadas em hematologia e Biologia Molecular (LAEBM) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade federal do Amazonas. Foram coletados a vácuo cinco mililitros de sangue venoso em EDTA (ácido etileno de aminotetracético di-sódico).

Relato de Caso

Paciente A.B.S - 01

Primogênito, sexo masculino, 60 anos de idade. As primeiras manifestações clínicas iniciaram aos 28 anos de idade caracterizada por fraqueza bilateralmente das mãos, associada aos sintomas primários de ptose palpebral bilateral, dormência nos dedos e na face das mãos, com piora progressiva. Aproximadamente dez anos após os primeiros sintomas, iniciou-se disfagia na deglutição de alimentos sólidos, alteração na fala, perda de peso, dificuldade em movimentar os olhos, parestesias nos pés e falta de

equilíbrio. Atualmente apresenta quadro de neuropatia com sensibilidade motora axonal, com ataxia sensitiva no movimento da marcha, paralisia facial bilateral e disfunção erétil. É tratado com Coenzima Q10, entretanto sem resposta promissora em nenhuma das doses de 100, 300 e 600mg/dia. Realiza reposição de vitamina B1 (de 300mg/dia) e B12 (150mg/dia) e amitriptilina (100mg/dia) para o quadro depressivo, como medo, ansiedade e alteração de humor.

Paciente F.B.S - 02

Sexo feminino, 57 anos de idade. Os primeiros sintomas relatados ocorreram aos 25 anos de idade com o aparecimento da ptose palpebral bilateral. Progressivamente apresentou ataxia sensitiva, oftalmoplegia e diabetes. Sucessivamente manifesta perda de equilíbrio e dificuldade de locomoção. Atualmente encontra-se em tratamento em terapia de reabilitação, hidroterapia, fisioterapia. É tratada para depressão para transtorno de humor e medo com amitriptilina (25mg/dia). Obteve bom prognóstico com uso da coenzima Q10 de 300mg/dia e uso de B12 (150mg/dia).

Paciente S.B.S - 04

Sexo feminino, 43 anos. Relata primeira crise de epilepsia aos 14 anos de idade e gradual aparecimento da ptose palpebral bilateral em condição progressiva. Os sintomas mais aparentes da doença só foram identificados aos 36 anos de idade. Atualmente apresenta ataxia, fraqueza muscular, oftalmoplegia e transtorno de humor. Realiza acompanhamento regular com uso de Coenzima Q10 de 300mg/dia e amitriptilina (100mg/dia). Encontra-se em reabilitação para hidroterapia, fisioterapia e tratamento psicológico.

Paciente S.B.L - 23

Sexo masculino, 19 anos de idade. Filho único da paciente SBS-04, natural de Manaus, porém, sem diagnóstico definitivo para a doença. É relatado ocorrência de convulsões desde os 13 anos de idade, mas sem outros sintomas relacionados com a OECP. Realiza o tratamento com Valproato de Sódio (250mg /dia).

Ensaio Molecular

Para investigação molecular realizou-se a extração do DNA pelo método de TRIzol®, onde também foi separado o RNA para análises futuras.

O sequenciamento foi realizado visando identificar possíveis mutações entre as regiões entre 2689 e 4242 pares de bases do DNAm (Primers Direto: CGTGAAGAGGCGGGCATAAC e Reverso: GCTAAGGTCGGGGCGGTGAT (Posição entre 2689-3520 pb) e Primers Direto TCCTAATGCTTACCGAACGA e Reverso AGGTTTGAGGGGAATGCTG (Posição entre 3362 e 4242 pb). Esta Região específica foi escolhida por ocorrer mais de 70% de todas mutações já descritas para OECP.

Os produtos amplificados para realização do sequenciamento gênico foram purificados pela metodologia *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent* (Thermofisher). O sequenciamento gênico foi realizado pelo método de SANGER (SANGER et al., 1977). Para esta metodologia, foi utilizado Sequenciador Automático *Applied Biosystems™ 3500*, utilizando-se o *Kit BigDye 03™* (Terminator Sequencing Standard- Applied Biosystems).

A reação de sequenciamento foi realizada em placas de fundo em V (MicroAmp 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems), utilizando-se 2,0 ul de Big Dye

Terminator, 2ul de primer (1,5 pmol), 2ul de tampão (Tris-Cl 200mM pH 9,0: 5 mM MgCl₂), 200 ng da PCR purificada e 5,6 ul de H₂O (Ultra Pura – GIBCO, Invitrogen, CA) em um total de 10 ul. As reações foram incubadas em termociclador T100[®] gradient (BIORAD-EUA), na temperatura inicial de 96°C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 96°C por 45 segundos; 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Análise dos genótipos da Glutathione S-transferase

Os genótipos da GSTM1 e GSTT1 foram caracterizados pela PCR Multiplex, utilizando o gene da β -globina como controle interno da reação (MOURA NETO et al., 2009, GONÇALVES et al. 2010). Para cada reação molecular, foram incluídos controles negativos e positivos para sua validação.

Nessa técnica, três pares de primers específicos para a amplificação de diferentes alvos foram incluídos na mesma reação. Os pares de primers para cada gene foram GSTM1 direto 5' CTGCCCTACTTGATTGATGGG 3' e reverso 5' CTGGATTGTAGCAGATCATGC 3'. Para GSTT1 direto 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' e reverso 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'. Para o gene β -globina 5' GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC3' e reverso 5' CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT 3'.

A PCR multiplex foi realizada em uma reação de 50 μ l de volume final contendo 5 μ l de DNA genômico, 1X tampão PCR, 2,5 μ l de MgCl₂, 2,0 μ l de dNTP, 0,15 μ l de cada primer e 0,4U Taq polimerase. O protocolo de PCR consistiu em uma desnaturação inicial de 45s a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45s, anelamento a 58°C por 45 s, alongamento a 72°C por 1 min 30s, e uma etapa final de alongamento a 72°C por 10 min.

Os produtos de PCR multiplex foram separados por eletroforese em brometo de etídio adicionado em gel de agarose a 1% corado com brometo a 100 V, 200mA por 30 min e visualizado em equipamento de detecção ultravioleta fotodocumentador GDS-1302 (ENDURO™ GDS) (Figura 1).

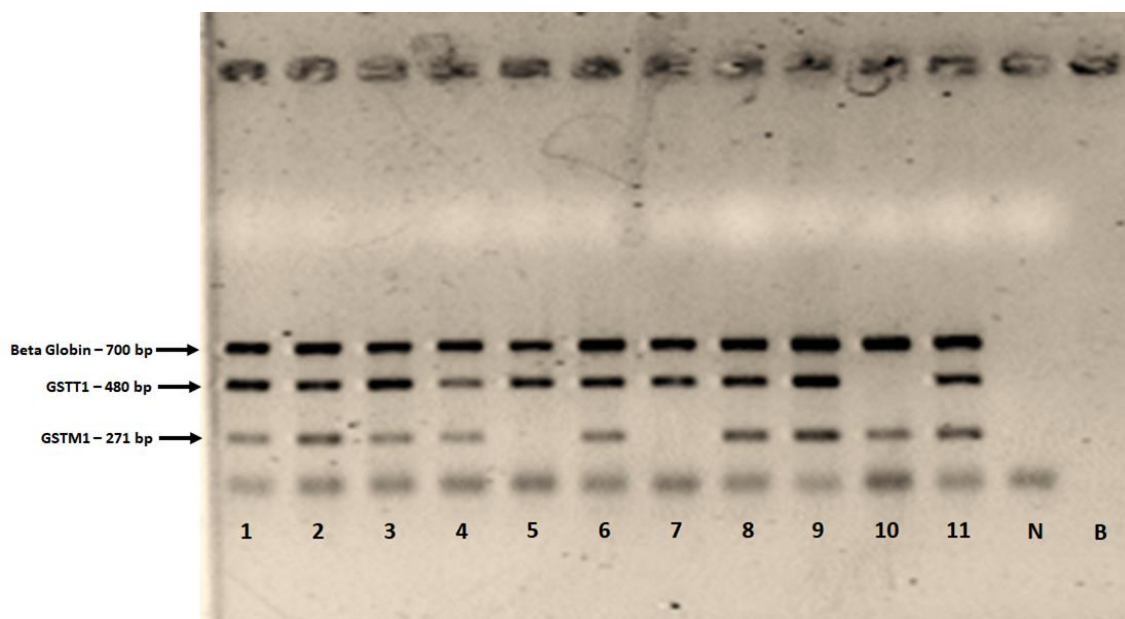


Figura 1 – Corrida eletroforética em gel de agarose a 1% pela técnica de PCR multiplex para os genes GSTM1 (271 pb), GSTT1 (400 pb), β -globina como controle interno (700 pb). Amostras 5 e 7 portadores da deleção da GSTM1, amostra 10 portadora da deleção GSTT1, N como negativo e B como Branco.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram compilados no programa estatístico SPSS v19 (CDC, Atlanta, Geórgia). A análise de normalidade da distribuição das variáveis foi realizada pelo teste de D'Agostino e Pearson.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (X^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Na análise de apenas dois grupos categóricos, as análises serão realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em

95% e a razão de prevalência serão calculados para essas variáveis. O nível de significância estatística será de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A figura 2 demonstra o Heredograma Familiar com variante patogênica para OECP ao longo de quatro gerações. Do total de 40 familiares, apenas em 27 realizou-se análises moleculares, uma vez que 2 são falecidos e o restante não quis participar do estudo.

A figura 3 demonstra a presença dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na mesma família. Apenas um (01) familiar não consanguínea apresentou a deleção para o gene Theta (GSTT1), enquanto a deleção do gene *MU* (GSTM1) foi presente em 53,3% dos familiares. A deleção de ambas deleções concomitantemente, Theta e UM, não foi encontrada.

Entre pacientes e voluntários, 14 (46,6%) descendentes diretos (1^a, 2^a e 3^a geração) e 2 (6,6%) descendentes indiretos (cônjuges) foram identificados com genótipo GSTM1 nulo, com 43,3% nulos para descendentes e parentes.

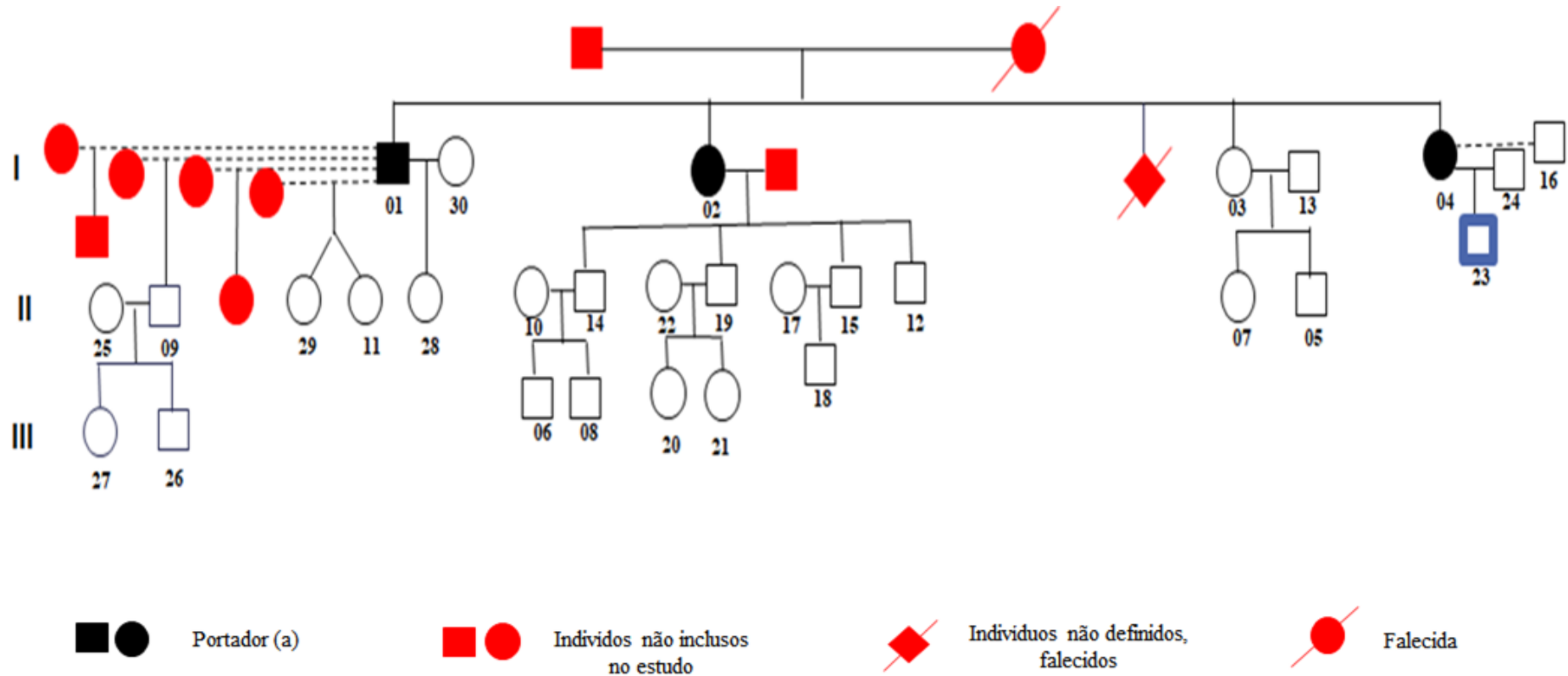


Figura 2 – Linhagem Familiar com variante patogênica para OECP ao longo de quatro gerações, incluindo membros da família afetados com OECP (**Pacientes 1, 2 e 3**) e um jovem com diagnóstico precoce (**Familiar 23**). Este heredograma demonstra os familiares incluídos e não incluídos do estudo. Do total de 40 familiares, apenas em 30 conseguimos amostras para análises moleculares e entrevista. Como doença mitocondrial, uma variante patogênica pode ser transmitida apenas de linhagens maternas.

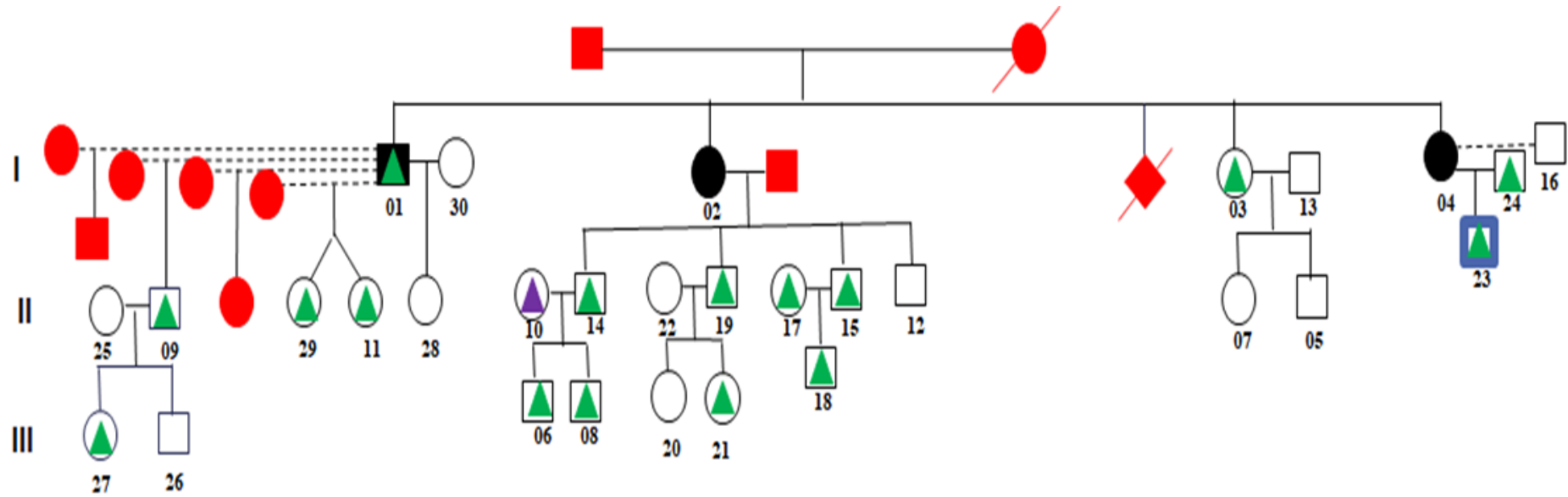


Figura 3 – Linhagem Familiar demonstrando os genótipos das GSTM1 e GSTTT1. Nota-se que apenas 1 familiar possui a deleção do gene Theta (GSTTT1), porém, não consanguínea. Já a deleção do gene *MU* (GSTM1) está presente em mais de 50% dos familiares, sendo apenas dois não consanguíneos.

Interessantemente, o genótipo GSTM1 nulo está presente em dois portadores da doença OECP, sendo que em ambos os pacientes, a clínica e agravos ligados a OECP iniciaram precocemente.

Curiosamente, a paciente dois (2) portadora da OECP possui GSTM1 normal, e sua clínica não é considerada tão grave como os pacientes 1 e 4. Desta forma, devido ao fato das primeiras manifestações clínicas da OECP iniciarem nestes também portadores da GSTM1 nulos (paciente 1 e 23) precocemente em comparação aos outros portadores de OECP que possuem o gene GSTT1, acredita-se que a presença da GSTM1 nulo influencia diretamente a capacidade das isoenzimas de reduzir o estresse oxidativo nestes pacientes, sendo um fator de risco para a gravidade e sintomas, levando em consideração o histórico da evolução e progressão da doença.

Com relação ao familiar número 3, acreditamos que esta não desenvolveu sintomas ou agravos relacionados à OECP devido sua heteroplasmia ser menor que 25%. Infelizmente não foi possível verificar esta projeção e por isso, apenas pode-se supor esta frequência pequena de mitocôndrias afetadas. Mesmo ela afetada pela deleção da GSTM1, ela não possui nenhuma manifestação clínica visível ou qualquer sintoma citado em seu prontuário médico.

Importante ressaltar que todas as 30 amostras colhidas (03 pacientes e 27 familiares voluntários) foi realizada sequenciamento para encontrar possíveis mutações no DNAm. Os resultados demonstraram presença de mutações somente em quatro amostras, sendo nos 3 pacientes diagnósticos e acompanhados por médico geneticista e em um filho de uma paciente portadora de OECP.

As mutações encontradas foram todas em heterozigose, o que já era esperado devido a heteroplasmia presente normalmente nestes indivíduos. Um total de nove (09) mutações foram demonstradas (Coordenadas GenBank 6350 e 6409 - Sequence ID: DQ658411.1). Todas as mutações encontradas ainda não foram descritas na literatura e estudos posteriores poderão relacioná-las com à doença OECP (Figuras 4, 5 e 6).

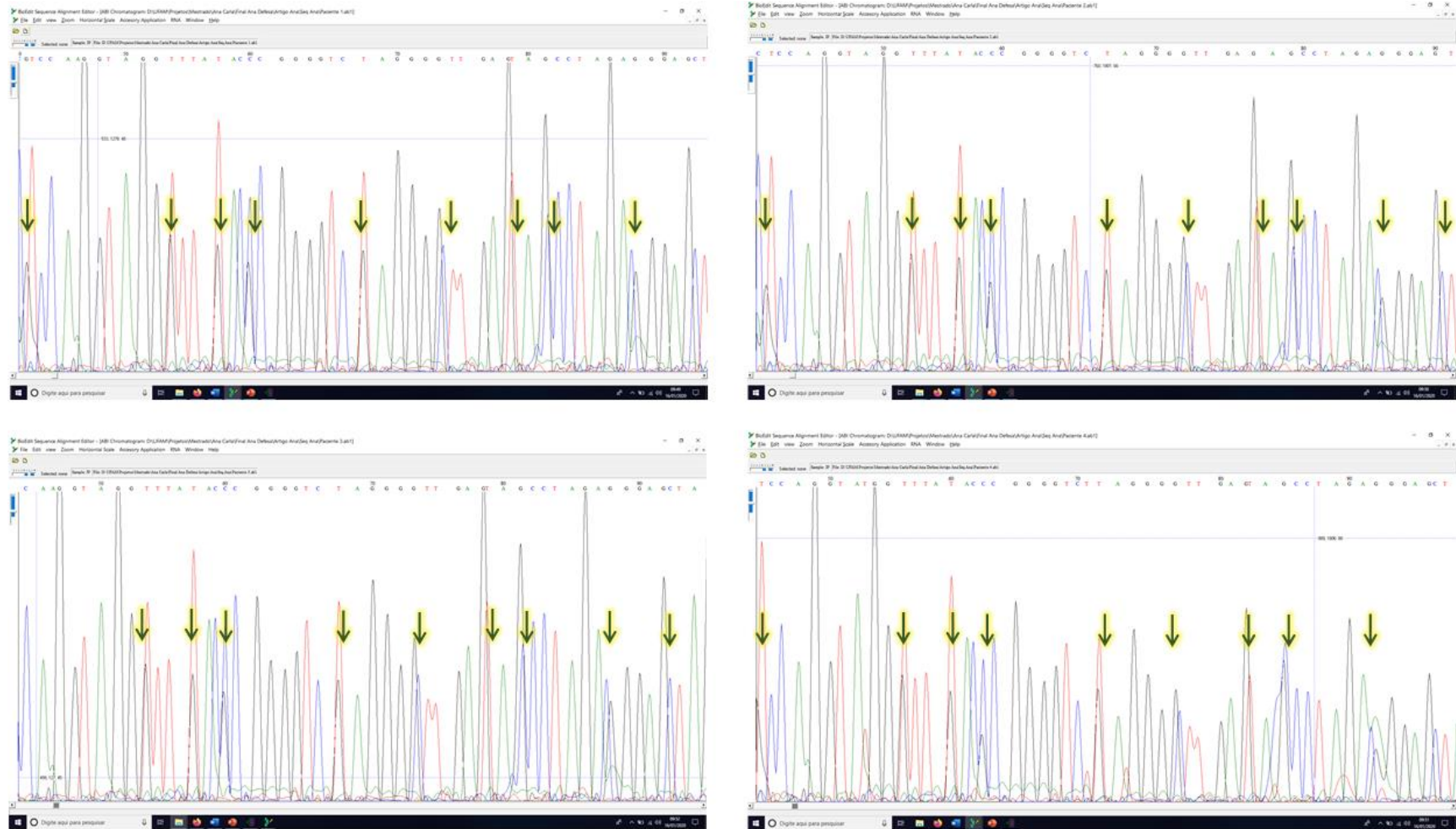


Figura 4 – Eletroferogramas demonstrando o sequenciamento do DNAmT dos três pacientes portadores de OECP e do Filho ainda sem sintomas graves e inconclusivo para OECP. As setas indicam locais das mutações ocorridas.

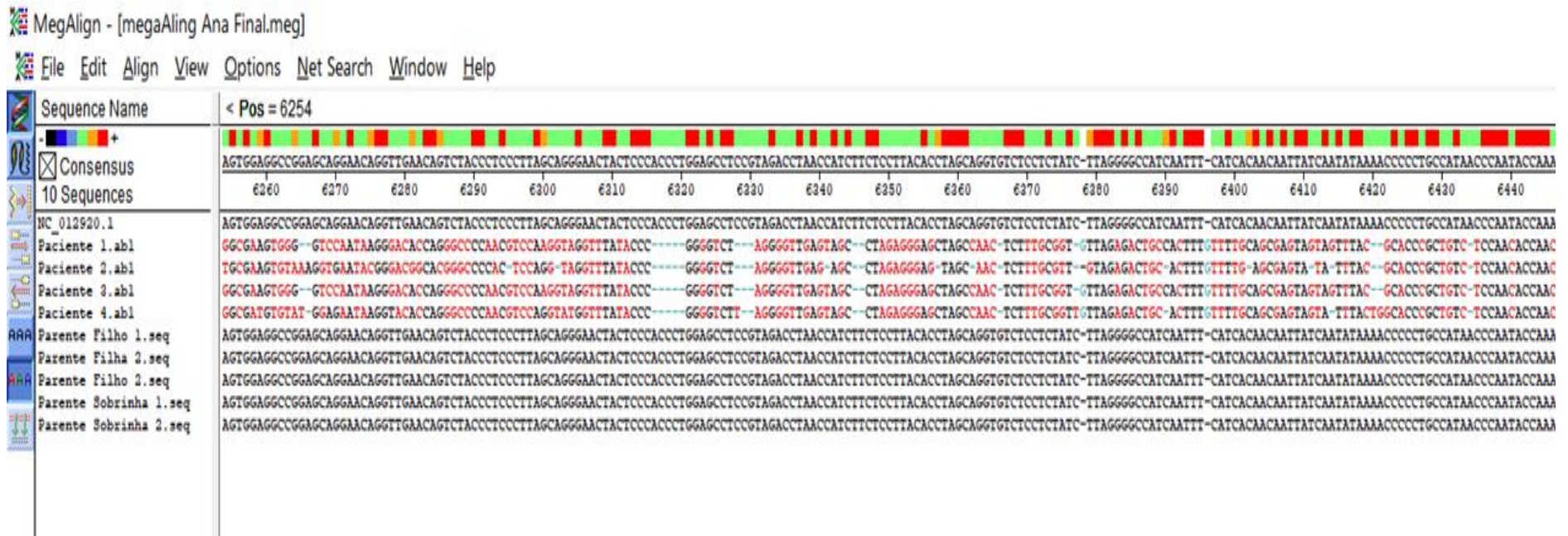


Figura 5 – Demonstração de alinhamento de sequências obtidas no sequenciamento para a região do DNAm_t realizado no programa MegAlign (DNASTAR).

The screenshot displays the NCBI BLAST web interface. The browser address bar shows the URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_107785150. The page title is "BLAST » blastn suite » results for RID-23JNHUF016".

Job Details:

- Job Title: Nucleotide Sequence
- RID: 23JNHUF016 (Search expires on 01-18 21:54 pm, Download All)
- Program: BLASTN (Citation)
- Database: nt (See details)
- Query ID: lcl|Query_33317
- Description: None
- Molecule type: dna
- Query Length: 119
- Other reports: Distance tree of results, MSA viewer

Filter Results:

- Organism: only top 20 will appear (exclude)
- Percent Identity: [] to []
- E value: [] to []
- Query Coverage: [] to []
- Buttons: Filter, Reset

Alignments:

- Alignment view: Pairwise (CDS feature)
- 13 sequences selected
- Download, GenBank, Graphics
- Next, Previous, Descriptions

Homo sapiens haplotype V mitochondrion, complete genome

Sequence ID: [DQ658411.1](#) Length: 16569 Number of Matches: 1

Range 1: 6350 to 6468 (GenBank, Graphics) (Next Match, Previous Match)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
176 bits(95)	2e-40	112/120(93%)	2/120(1%)	Plus/Plus

Query 1: CTTACGACCTAGCAGG-GTGTCCCTCTAGCTTAGGGGCATCAATTGCARCACACAAATTA 59
 Sbjct 6350: CTTAC-ACCTAGCAGGTGTCTCCCTCTATCTTAGGGGCATCAATTCATCACACAAATTA 6408

Query 60: CCAATATAAAAAGCCCCCTGCCATAACCCCAATACCAAAACCCCCCTCTCGTCTCATCCGTCC 119
 Sbjct 6409: TCAATATAAAAACCCCTGCCATAACCCCAATACCAAAACCCCCCTCTCGTCTCATCCGTCC 6468

Windows taskbar at the bottom shows the search bar "Digite aqui para pesquisar" and the system tray with the date 17/01/2020 and time 11:55.

Figura 6 – Demonstração de alinhamento da sequência obtidas pelo sequenciamento para a região das mutações encontradas realizado no programa BLAST.

DISCUSSÃO

Como já descrito este estudo teve a finalidade de identificar alterações genéticas no DNA mitocondrial (DNAMt) e deleções nucleares nos genes GSTM1 e GSTT1 em portadores de oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP). A família de pacientes e voluntários foram avaliados na intenção de buscar uma possível correlação do polimorfismo GST (GSTM1 e GSTT1) com a clínica e gravidade da OECP.

Deleções no GSTM1 e GSTT1 são frequentes na população mundial, incluindo a brasileira. A deleção do genótipo GSTM1 é observada em frequências que variam de 20 a 70% nas diferentes populações, enquanto para o gene GSTT1 esta variação é de 11 a 38% (ARRUDA et al., 1998; BUFALO et al., 2006; BID et al., 2010). Polimorfismos nos genes das GSTs têm sido associados com o risco para várias doenças, como o câncer e doenças infecciosas. Gonçalves e col. (2010) demonstraram que indivíduos com genótipo GSTT1 nulo apresentaram maior susceptibilidade para o desenvolvimento de leucopenia, neutropenia, enquanto outros ligavam a gravidade do câncer de mama (HAYES, et al. 1995; ECONOMOPOULOS & SERGENTANIS, 2010). A GSTM1 nulo ocorre em até 50% da população mundial e é a mais recorrente em associação com diversos tipos de cânceres (ROSSINI et al., 2002; GASPAR et al., 2004).

Em indivíduos afetados com a doença mitocondrial OECP, claramente ocorre a elevação do stress oxidativo (SANTA CATERINA et al., 2018). Os resultados demonstraram uma possível correlação da GSTM1 nulo com a gravidade e início precoce dos sintomas para OECP, uma vez que indivíduos portadores dessa doença mitocondrial são acometidos por elevados danos oxidativos resultantes das disfunções da instabilidade do DNAMt. O encontro da deleção GSTM1 em dois portadores e estes terem iniciado os sintomas precocemente, pode ser considerado um fator de risco para a doença, bem como maior gravidade dos sintomas.

O processo da respiração celular nas mitocôndrias produz normalmente espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse sistema existem diversas enzimas antioxidantes, porém, a GSTM1 possui papel fundamental na eliminação do excesso dos EROs e de outros radicais livres (ADDAYA et al., 1994; RAZA et al, 2002).

A ação dos radicais livres no interior da célula pode produzir lesões em diferentes compostos, incluindo as lipoproteínas das membranas das organelas, incluindo a mitocondrial, o que leva a GSTM1 possuir ação importante como papel protetor diante dos processos deletérios e danos oxidativos ao DNAm (MARÍ et al., 2009; RIBAS et al., 2014). Na ausência da enzima GSTM1, a eliminação eficiente de EROS é deficiente e pode ser considerada um fator de risco para o aumento de mutações de DNAm (LIO et al., 2002; PAVICIC et al., 2009).

Como descrito por Koka & Patel (2019) a doença OECP é considerada tardia por aparecimento aproximadamente entre 30 a 40 anos. Neste estudo foram identificados quatro descendentes 14, 15, 19 e 23 com GSTM1 nulo, cuja herança materna é afetada pela doença mitocondrial OECP. Estes descendentes, mesmo sem apresentação clínica da doença, devem ter atenção e consideração médica para qualquer sintoma tardio que por ventura apareça, mesmo que saibamos que a OECP é influenciada por limiar de expressão e heteroplasmia. Entretanto o voluntário 23 também descendente e afetado pela GSTM1 nulo, apresenta clínica da doença desde 13 anos. Portanto, o polimorfismo GST pode ser um fator de gravidade clínica nesse paciente.

Cumpramos ressaltar que este é o primeiro trabalho na literatura que discorre sobre provável relação de polimorfismos GSTs com a gravidade clínica em pacientes diagnosticados com a doença mitocondrial OECP.

REFERÊNCIAS

- ADDYA S, MULLICK J, FANG JK, AVADHANI NG. (1994). **Purification and characterization of a hepatic mitochondrial glutathione S-transferase exhibiting immunochemical relationship to the alpha-class of cytosolic isoenzymes.** Arch. Biochem. Biophys. 310:82–8.
- AGOSTINO, A; VALLETTA, L; CHINNERY, P.F; FERRARI, G; CARRARA, F; TAYLOR, R.W; SCHAEFER, A.M; TURNBULL, D.M; TIRANTI, V; ZEVIANI, M. **Mutations of ANT1, Twinkle, and POLG1 in sporadic progressive external ophthalmoplegia (PEO).** Neurology 60 (2003) 1354 -1356.
- ARRUDA, V. R.; GRIGNOLLI, C. E.; GONÇALVES, M. S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. **Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis?** Clinical Genetics, v. 54, p. 210-214,1998.
- B.W. SMITS, J. FERMONT, C.C. DELNOOZ, J.S. KALKMAN, G. BLEIJENBERG, B.G. VAN ENGELEN. **Disease impact in chronic progressive external ophthalmoplegia: more than meets the eye** Neuromuscular Disorders 21 (2011) 272 - 278.
- BID, H. K.; KONWAR, R.; SAXENA, M.; CHAUDHARI, P.; AGRAWAL, C.G.; BANERJEE, M. **Association of glutathione S-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in north Indian population.** J. Post. Grad. Med.,v. 56, n. 3, p. 176-181, 2010.
- BUFALO, N. E.; LEITE, J. L.; GUILHEN, A. C.; MORARI, E. C.; GRANJA, F.; ASSUMPCAO, L. V.; WARD, L. S. **Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants.** Endocr. Relat. Cancer, v.13, p. 1185-93, 2006.
- COLLEEN, M; BOSWORTH, S.G; MEETHA, P.G&THOMAS, L. **Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequence data.** BMC Bioinformatics. 2017.
- CRUZ, S; TAIPA, R; NOGUEIRA, C; PEREIRA, C; ALMEIDA, L.S; NEIVA, R; GERALDES, T; GUIMARÃES, A; MELO-PIRES, M; VILARINHO, L. **Clinical, biochemical, molecular, and histological features of 65 Portuguese patients with mitochondrial disorders.** Muscle Nerve. 2017.
- DUNNEN, T; ANTONARAKIS, E. **Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion.** Human Mutation: 2000 15:712.
- ECONOMOPOULOS, K. P., & SERGENTANIS, T. N. **GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTA1 and colorectal cancer risk: A comprehensive meta-analysis.** European Journal of Cancer, 2010: 46(9), 1617–1631.
- G. PFEFFER, G.S. GORMAN, H. GRIFFIN, M. KURZAWA -AKANBI, E.L. BLAKELY, I. WILSON, K. SITARZ, D. MOORE, J.L. MURPHY, C.L. ALSTON. **Mutations in the SPG7**

gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial. DNA maintenance Brain 137 (2014) 1323 -1336.

GASPAR, P.A; HUTZ, M.H; SALZANO, F.M; HILL, K; HURTADO, A.M; PETZ-ERLER, M.L. **Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1 and p53 genes in ameridians.** American Journal Of Anthropology. V.199, p.249-256, 2002.

GHORBEL, R., BEN SALAH, G., GHORBEL, R., BEN MAHMOUD, A., CHAMKHA, I., MKAOUAR-REBAI, E; FAKHFAKH, F. (2017). **Os polimorfismos de GSTM1 e GSTT1 influenciam o risco de desenvolver doenças mitocondriais em uma população da Tunísia?** Pesquisa sobre Ciência e Poluição Ambiental, 25 (6), 5779-5787

GLUTZ, S; BORRUAT, F.X; HIRT, L. **Ocular mitochondrial myopathies: a spectrum of clinical presentations.** Klin Monatsbl Augenheilkd. 1998;212(5):299-300. French.

GONÇALVES, MS; MOURA NETO, JP; SOUZA, C.L; MELO, P; REIS, M.G. **Evaluating glutathione S-transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leukopenia.** Int J Lab Hematol. 2010 Feb;32(1 Pt 1):49-56.

GRIFFIN, TJ E SMITH, LM. **Análise de polimorfismo de nucleotídeo único por espectrometria de massa MALDI-TOF.** Trends in Biotechnology: 2000 18 (2), 77-84.

HAYES, John D.; PULFORD, David J. **The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I.** Critical reviews in biochemistry and molecular biology, v. 30, n. 6, p. 445-520, 1995.

HEIGHTON, J.N; BRADY, L.I; NEWMAN, M.C; TARNOPOLSKY, M.A. **Clinical and demographic features of chronic progressive external ophthalmoplegia in a large adult.** Onset cohort Mitochondrion 44 (2019) 15 -19.

KOKA K, PATEL BC. **Ptosis Correction.** Source Stat Pearls. Treasure Island (FL): StatPearls: Publishing, 2019.

LEE, AG, & BRAZIS, PW (2002). **Oftalmoplegia externa progressiva crônica.** Relatórios atuais de Neurologia e Neurociência, 2 (5), 413–417. doi: 10.1007 / s11910-002-0067-5.

LIMA, Brena de Lourdes Aguiar. **Caracterização molecular das enzimas glutathione S transferase (genes gstm1, gstm1 e gstm1) em pacientes com malária por plasmodium vivax.** 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

LIU, C. S & TSAI, C.S. **Enhanced Lipid Peroxidation in Epileptics with Null Genotype of Glutathione S-Transferase M1 and Intractable Seizure.** The Japanese Journal of Pharmacology, 2002: 90(3), 291–294

MARGULIS L. **Origin of Eukaryotic Cells; Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth.** Yale University Press, New Haven (1970)

MARÍ, M; MORALES, A; COLELL, A; GARCÍA-RUIZ, C; FERNÁNDEZ-CHECA J.C. **Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant.** *Antioxid. Redox Signal.* 2009; 11: 2685-2700

MELO, P & VILARINHO, L. **Clinical, biochemical, molecular, and histological features of 65 Portuguese patients with mitochondrial disorders.** *Muscle & nerve* 56 (2017) 868 - 872.

MORAES, CT, DIMAURO, S., ZEVIANI, M., LOMBES, A., SHANSKE, S., MIRANDA, AF,... ROWLAND, LP (1989). **Deleções do DNA mitocondrial na oftalmoplegia externa progressiva e na síndrome de Kearns-Sayre.** *New England Journal of Medicine*, 320 (20), 1293–1299

MOSLEMI AR, MELBERG A, HOLME E, OLDFORS A: **Oftalmoplegia externa progressiva autossômica dominante: distribuição de múltiplas deleções mitocondriais de DNA.** *Neurology* 1999, **53** : 79-84.

PAVICIC, WH, LAGUENS, M., & RICHARD, SM (2009). **Associação de análise entre instabilidade do genoma mitocondrial e genes metabolizadores xenobióticos no câncer de mama humano.** *Molecular Medicine*, 15 (5-6), 160-165

PINHEL MA, NAKAZONE MA, CAÇÃO JC, PITERI R, DANTAS RT, GODOYMF, et al. **Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: Association study and relationship with apolipoprotein 4 allele.** *Clin Chem Lab Med.* 2008;46:439—45.10.

RAZA H, ROBIN MA, FANG JK, AVADHANI GN. (2002). **Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S transferases and their differential induction under oxidative stress.** *Biochem. J.* 366:45–55.

RIBAS, V; GARCÍA-RUIZ, C; FERNÁNDEZ-CHECA, J.C. **Glutathione and mitochondria.** *Front. Pharmacol.* 2014; 5: 151.

ROSSINI, A; RAPOZO, A.C; AMORIM, L.M; MACEDO, J.M; MEDINA, R. **Frequence of gstt1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms in brazilian population.** *Genetics and Molecular Research.* V.1, p.233-240, 2002.

SANTACATTERINA, F; TORRESANO, L; NÚÑEZ-SALGADO, A; ESPARZA-MOLTO, P.B; OLIVE, M; GALLARDO, E; CUEZVA, J.M. **Different mitochondrial genetic defects exhibit the same protein signature of skeletal muscle metabolism in PEO and MELAS patients: a role for oxidative stress.** *Free Radical Biology and Medicine*, 2018: 126, 235-248.

UZUNO-GLUS, ACAR H, OKUDAN N, GÖKBEL H, MEVLITOĞLU I, SARIF. **Evaluation of the association between null genotypes of glutathione-S-transferases and Behcet's disease.** *Arch Dermatol Res.* 2006;297:289—93.11

WILLIAMS JA1, PHILLIPS DH. **Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer.** *Cancer Res.* 2000 Sep 1;60(17):4667-77.

7. CONCLUSÕES FINAIS

- Demonstraram 09 novas mutações no DNAm^t correlacionadas a doença Oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP);
- GSTM1 nulo possivelmente ligada ao início precoce e gravidade clínica na OeCP;
- Primeiro estudo correlacionando genótipos da GST e OECP.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIN-PEREZ, R. & ENRIQUEZ, J. A. **The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model.** *Biochim Biophys Acta*, 2014.
- AHUJA, A. S. **Understanding mitochondrial myopathies: A review.** *PeerJ*, 2018.
- AGAMANOLIS D. **Mitochondrial disorders.** *Neuropathology*, 2017
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K e WALTER P. **Biologia Molecular da Célula.** 4ª edição, Porto Alegre, Artmed, 2004.
- ANDERSON, S. et al. **Sequence and organization of the human mitochondrial genome.** *Nature*, v.290, p.457-465, 1981.
- ARRUDA, V. R.; GRIGNOLLI, C. E.; GONÇALVES, M. S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. **Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis?** *Clinical Genetics*, v. 54, p. 210-214, 1998.
- BINDU, P.S; SONAM, K; GOVINDARA, J.PG; OVINDARAJU, C; CHIPLUNKAR, S; NAGAPPA, M; KUMAR, R; VEKHANDE, C.C; ARVINDA, H.RG; AYATHRI, N; SRINIVAS, M.MP; ONMALAR, J.N.J; PHILIP, M; VANDANA, V.P.K; HAN, N.AN; UNIA, VP; ARAMASIVAM, A.S; INHA, S; THANGARAJ, K.T; ALY A.B. **Outcome of epilepsy in patients with mitochondrial disorders: Phenotype genotype and magnetic resonance imaging correlations.** *Clin Neurol Neurosurg*, 2018.
- BHATTI, J. S., KUMAR, S., VIJAYAN, M., BHATTI, G. K., & REDDY, P. H. **Therapeutic Strategies for Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Age-Related Metabolic Disorders.** *Molecular Biology of Aging*, 13–46, 2017.
- BID, H. K.; KONWAR, R.; SAXENA, M.; CHAUDHARI, P.; AGRAWAL, C.G.; BANERJEE, M. **Association of glutathione S-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in north Indian population.** *J. Post. Grad. Med.*, v. 56, n. 3, p. 176-181, 2010.
- BUFALO, N. E.; LEITE, J. L.; GUILHEN, A. C.; MORARI, E. C.; GRANJA, F.; ASSUMPCAO, L. V.; WARD, L. S. **Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants.** *Endocr. Relat. Cancer*, v.13, p. 1185-93, 2006.
- BURGER, G; MOREIRA, S & VALACH, M. **Genes in Hiding.** *Trends Genet*, 2016.

CABALLERO, P.E; ALVAREZ, C.I; TEJERINA, A.A. **Chronic progressive external ophthalmoplegia: a report of 6 cases and a review of the literature.** Neurologist. 2007;13(1):33-6.

CARLOW, T.J, DEPPER, M.H, ORRISON, W.W. **MR of extraocular muscles in chronic progressive external ophthalmoplegia.** AJNR Am J Neuroradiol. 1998;19(1): 95-9.

CHEN, T.P.U.C; SHI, Q; WANG, Q; CONG, L et al. **Chronic progressive external ophthalmoplegia with inflammatory myopathy.** Int J Clin Exp Pathol. 2014.

COGLIATI, S; LORENZI, I; RIGONI, G;CAICCI, F& SORIANO, M. E. **“Regulation of mitochondrial electron transport chain assembly”.** Journal of Molecular Biology. 2018.

COLLEEN, M; BOSWORTH, S.G;MEETHA, P.G&THOMAS, L. **Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequence data.** BMC Bioinformatics. 2017.

CRUZ, S; TAIPA, R; NOGUEIRA, C; PEREIRA, C; ALMEIDA, L.S; NEIVA, R; GERALDES, T; GUIMARÃES, A; MELO-PIRES, M; VILARINHO, L. **Clinical, biochemical, molecular, and histological features of 65 Portuguese patients with mitochondrial disorders.** Muscle Nerve. 2017.

CRUZ, A.C.P; FERRASA, A; MOUTRI, A.R; HERAI, R.H. **Frequency and association of mitochondrial genetic variants with neurological disorders.** Mitochondrial, 2018.

DALLNER, G & SINDELAR, P.J. **Regulation of ubiquinone metabolism.** Free Radic Biol Med, 2000.

DEROSA G, D'ANGELO A, MAFFIOLI P. **Coenzyme q10 liquid supplementation in dyslipidemic subjects with statin-related clinical symptoms: a double-blind, randomized, placebo-controlled study.** Drug Des Devel Ther. 2019 Oct 21;13:3647-3655.

DIMAURO, S., & SCHON, E. A. **Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases.** New England Journal of Medicine, 348(26), 2656–2668, 2003.

EL-HATTAB, A. W., CRAIGEN, W. J., & SCAGLIA, F. **Mitochondrial DNA maintenance defects.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1863(6), 1539–1555, 2017.

ENRIQUEZ, J. A. **Supramolecular Organization of Respiratory Complexes.** Annu Rev Physiol, 2016.

FARRUGGIA, P.D.I; MARCO, F; DUFOUR, C. **Pearson syndrome.** Expert Rev Hematol, 2018.

Genetics Home Reference: your guide to understanding genetic conditions. National Institutes of Health, U.S. National Library of Medicine. Progressive external ophthalmoplegia. Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/progressive-external-ophthalmoplegia>.

GHORBEL, R., BEN SALAH, G., GHORBEL, R., BEN MAHMOUD, A., CHAMKHA, I., MKAOUAR-REBAI, E; FAKHFAKH, F. (2017). **Os polimorfismos de GSTM1 e GSTT1 influenciam o risco de desenvolver doenças mitocondriais em uma população da Tunísia?** Pesquisa sobre Ciência e Poluição Ambiental, 25 (6), 5779-5787

GOLONI-BERTOLLO, Eny Maria. **Avaliação da influência da nulidade dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço.** Rev Assoc Med Bras, v. 52, n. 5, p. 8-365, 2006.

GONZÁLEZ-QUEVEDO A, SANTIESTEBAN FREIXAS R, EELLS JT, LIMA L. **Cuban Epidemic Optic Neuropathy. An appraisal of the pathophysiological mechanisms.** In: Holmgren A, Borg G, editors. Handbook of Disease Outbreaks: Prevention, Detection and Control. New York: Nova Science Publishers; 2010. p. 43–73

GONCALVES, M. S. et al. **Evaluating glutathione S-transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leukopenia.** International journal of laboratory hematology, v. 32, p. e49–e56, fev. 2010.

GORMAN, G.S; CHINNERY, P.F; DIMAURO, S; HIRANO, M; KOGA, Y; MCFARLAND, R; SUOMALAINEN, A; THORBURN, D.R; ZEVIANI, M; TURNBULL, D.M. **Mitochondrial diseases.** Nat Rev Dis Primers, 2016.

GYLLENSTEN U, WHARTON D, JOSEFSSON A, WILSON AC. **Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice.** Nature 352:255–257, 1991.

HAYES, John D.; PULFORD, David J. **The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I.** Critical reviews in biochemistry and molecular biology, v. 30, n. 6, p. 445-520, 1995.

HEIGHTON, J. N., BRADY, L. I., SADIKOVIC, B., BULMAN, D. E., & TARNOPOLSKY, M. A. **Genotypes of chronic progressive external ophthalmoplegia in a large adult-onset cohort.** Mitochondrion, 2019.

HIRANO M. **Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy disease.** Gene Reviews Epub ahead, 2016.

JACKSON, T. D; PALMER, C. S & STOJANOVSKI, D. **Mitochondrial diseases caused by dysfunctional mitochondrial protein import.** Biochemical Society, 2018.

JAFARI, M; MOUSAVI, S.M; ASGHARZADEH, A; YAZDANI, N. **Coenzyme Q10 in the treatment of heart failure: A systematic review of systematic reviews.** Indian Heart J. 2018.

JOHNS, D.R. **Mitochondrial DNA and disease.** N Engl J Med, 1995.

FRIEDMAN, Jhonathan R & NUNNARY, JODI. **Mitochondrial form and function.** Nature. 2014 Jan 16; 505(7483): 335–343.

KANG E, et al. (2016) **Mitochondrial replacement in human oocytes carrying pathogenic mitochondrial DNA mutations.** *Nature* 540:270–275, 2016.

KIYOMOTO, B.H; GABBAL, A.A; OLIVEIRA, A.S; SCHMIDT, B;LIMA, J.G. **Mitochondrial myopathy: report of 12 cases with histochemical study of the skeletal muscle.** *Arq Neuropsiquiatr*, 1991.

KLUG, W. S. et al. **Conceitos de Genética.** 9 ed. São Paulo: Artmed, 863 p. 2010.

LARSSON, N.G; CLAYTON, D.A. **Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders.** *Ann Rev Genet*, 1995.

LEE, R.G; RUDLER, DL; RACKHAM, O; FILIPOVSKA, A. **Is mitochondrial gene expression coordinated or stochastic?** *Send to Biochem Soc Trans*, 2018.

LEGATI, A.A; REYES A.B; NASCA, AA; INVERNIZZI, A.F; LAMANTEA, E. A; TIRANTI, V. A; GARAVAGLIA, B.A; LAMPERTI, C.A; ARDISSONE, A.C; MORONI, I.C; ROBINSON, A.B; GHEZZI, D.A; ZEVIANI, M. **New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS Technologies.** *ELSIEVER*, 2016.

LI, Y. R., JIA, Z., & TRUSH, M. A. **Defining ROS in Biology and Medicine.** *Reactive Oxygen Species*, 1(1), 9–21, 2016

LUO, S; VALENCIA, C. A; ZHANG, J; LEE, N.C; SLONE, J; GUI, B; HUANG, T. **Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201810946, 2018.

MARGULIS L. **Origin of Eukaryotic Cells; Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian.** *Earth Yale University Press*, New Haven, 2001.

MARTIN, Picard; ORIAN, S; SHIRIHAI, Benoit J; GENTIL, Yan, B. **Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013.

MASOOD N, YASMIN A, KAYANI MA. **Genetic deletions of GSTM1 and GSTT1 in head and neck cancer: review of the literature from 2000 to 2012.** *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3535-9.

MCCLELLAND, C; MANOUSAKIS, G; LEE, M.S. **Progressive External Ophthalmoplegia.** *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016.

MIAO, Li-Feng et al. **Combined effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on breast cancer risk: A MOOSE-compliant meta-analysis and false-positive report probabilities test.** *Medicine*, v. 98, n. 6, 2019.

MORAES CT, DIMAURO S, ZEVIANI M, LOMBE'S A, SHANSKE S, MIRANDA A, et al. **Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome.** N Engl J Med 1989; 320: 1293–9.

Muscular Dystrophy Association (MDA). Mitochondrial myopathies causes inheritance. Muscular Dystrophy Association, 2018.

NASS, M.M.K; NASS S. **Intramitochondrial fibers with DNA characteristics: I. Fixation and electron staining reactions.**J Cell Biol, 19:593, 1963.

NASSEH IE, TENGAN CH, KIYOMOTO BH e GABBAI AA. **Doenças mitocondriais.** Revista Neurociências, 2001.

NUSSBAUM, RL; MCINNES, RR; WILLARD, HF. **Thompson & Thompson Medical Genetics.** 8. ed .: Elsevier, 2015.

PAVICIC, WH, LAGUENS, M., & RICHARD, SM (2009). **Associação de análise entre instabilidade do genoma mitocondrial e genes metabolizadores xenobióticos no câncer de mama humano.** Molecular Medicine, 15 (5-6), 160-165.

PFEIFFER, M. **Ptosis bei chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie: diagnostische Probleme und therapeutische.** Konsequenzen. Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde, 235(01), 31–33, 2018.

PLJESA-ERCEGOVAC M, SAVIC-RADOJEVIC A, MATIC M, CORIC V, DJUKIC T, RADIC T, SIMIC T. **Glutathione Transferases: Potential Targets to Overcome Chemoresistance in Solid Tumors.** Int J Mol Sci. 2018 Nov 28;19(12). pii: E3785.

PLATTO, V.B. et al. Genética molecular da deficiência auditiva não sindrômica. Rev Bras Otorrinolaringol.v.71, n.2, p. 216-23, mar./abr,2005.

RADELFAHR, F& KLOPSTOCK, T. **Diagnostic and Therapeutic Approaches for Mitochondrial Diseases.** Fortschr Neurol Psychiatr, 2018.

RAMOS, Hernández C; MOURONTE, Roibás C; BARROS, Dios J.M; FERNÁNDEZ, Villar A; RUANO, Ravina A. **Deletion of GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer survival: a systematic review.** Tumori. 2017 Jul 31;103(4):338-344.

RAMAKRISHNAN, S; YADAV, R; ADWANI, S et al. **Vocal cord palsy in a case of chronic progressive external ophthalmoplegia.** Ann Indian Acad Neurol, 18 (4), pp. 481-483, 2015.

RITAMBHARA; TIWARI, Sonia; VIJAYARAGHAVALU, Sivakumar; KUMAR, Munish. **Genetic Polymorphisms of Xenobiotic Metabolizing Genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1), Gene-Gene Interaction with Association to Lung Cancer Risk in North India; A Case Control Study.** Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: Vol 20, 2019.

ROPPER AH, VICTOR M, SAMUELS MA, ADAMS RD. ADAMS & VICTOR's. **Principles of Neurology.** 9th ed. New York, NY: McGraw Hill Medical; 2009.

RUSSEL, O & TURNBULL, D. **Mitochondrial DNA disease molecular insights and potential routes to a cure.** Exp Cell Res, 2014.

SAGER, Ruth & LANE Doroth. **Molecular Basis of Maternal Inheritance.** Proceedings of the National Academy of Sciences: 69(9), 2410–2413, 1972.

SCARPELLI, M; ZAPPINI, F; FILOSTO, M; RUSSIGNAN, A; TONIN, P; TOMELLERI, G. **Mitochondrial Sensorineural Hearing Loss: A Retrospective Study and a Description of Cochlear Implantation in a MELAS.** Patient. Genet Res Int, 2012.

SENA, L. A& CHANDEL, N. S. **Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species.** Mol Cell, 2012.

SGARBI, G.L; IUZZI, F.B; ARACCA, A.S; OLAINI, G. Resveratrol preserves mitochondrial function in a human post-mitotic cell model. **J Nutr Biochem, 2018.**

SHIN-ICHI USAMI & SHIN-YA NISHIO. **Nonsyndromic Hearing Loss and Deafness, Mitochondrial.** GeneReviews® [Internet]. Initial Posting: October 22, 2004; Last Update: June 14, 2018.

SHRIDHAR, K., AGGARWAL, A., WALIA, G. K., GULATI, S., GEETHA, A. V., PRABHAKARAN, D; RAJARAMAN, P. (2016). **Single nucleotide polymorphisms as markers of genetic susceptibility for oral potentially malignant disorders risk: Review of evidence to date.** Oral Oncology, 61, 146–151.

SMITH, S. D; JAMPEL, H. D; SINGH, K; LIN, S. C; CHEN, T. C; FRANCIS, B. A; HODAPP, E. **Assessment of Visual Function in Glaucoma.** Ophthalmology, 2011: 118(5), 986–1002.

SWIFT AC & SINGH SD. **Hearing impairment and the Kearns-Sayre syndrome.** J. Laryngol. Otol., 1988;102:626-7.

SOINI, H. K., KARJALAINEN, M. K., HINTTALA, R., RAUTIO, A., HALLMAN, M., & UUSIMAA, J. **Mitochondrial hearing loss mutations among Finnish preterm and term-born infants.** Audiology Research, 2017.

SOUZA, C.F.M. **Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005.

STEFANO, G. B., BJENNING, C., WANG, F., WANG, N., & KREAM, R. M. **Mitochondrial Heteroplasmy.** Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Medicine, 577–594, 2017.

SUTOVSKY P et al. **Ubiquitin tag for sperm mitochondria.** Nature 402:371–372, 1999.

TAVARES, L. F. F. **Neuroproteção: abordagem na doença de Parkinson.** 2015, 55f, Dissertação (mestrado em medicina), Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2015.

TAYLOR RW, et al. (2003) **Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution.** *Ann Neurol* 54:521–524.

TUPPEN, M.TURNBULL&TAYLOR, R.W. **Mitochondrial DNA mutations and human disease.** Elsevier, 2010.

TURI, A; GIANNUBILO, S.R; BRUGE F, et al. **Coenzyme Q10 content in follicular fluid and its relationship with oocyte fertilization and embryo grading.** *Arch Gynecol Obstet*, 2012.

United Mitochondrial Disease Foundation. *Understanding mitochondrial disease*, 2017.

VAN ESVELD, S.L&HUYNEN, M.A. **Does mitochondrial DNA evolution in metazoa drive the origin of new mitochondrial proteins?***IUBMB Life*. 2018.

VERDE, R; ALLEN, L.H; BJORKE-MONSEN, A.L; BRITO, U.M;GUEANT, J.L;MILLER, J.W;MOLLOY, A.M;NEXO, E;STABLER, S;TOH, B.H;UELAND, P.M;YAJNIK, C. **Vitamin B 12 deficiency.***Nat Rev Dis Primers*. 2017.

VISCOMI, C; ZEVIANI, M. **MtDNA-maintenance defects: syndromes and genes.** *J. Inherit. Metab*, 2017

WACHSMUTH, M; HUBNER, A; LI, M; MADEA, B. & STONEKING, M. **Age-Related and Heteroplasmy-Related Variation in Human mtDNA Copy Number.** *PLoS Genet*, 2016.

WILLIAMS, B. A & KEELING, P. J. **Cryptic organelles in parasitic protists and fungi.** *Adv Parasitol*, 2003.

WILLIAMS, S. L., MASH, D. C., ZÜCHNER, S., AND MORAES, C. T. **Somatic mtDNA mutation spectra in the aging human putamen.** *PLoS Genet*. 9:e1003990, 2018.

WHITE KP, SPEENCHLEY M, HARTH M, OSTBYE T. **Comparing selfreported function and work disability in 100 community cases of fibromyalgia syndrome versus controls in London, Ontario.** *Arthritis and Rheum* 42: 76-83, 1999.

XIE, L.L; SHI, F; TAN, Z; LI, Y; BODE, A.M; CAO, Y.**Mitochondrial network structure homeostasis and cell death.** *Cancer Sci*. 2018.

YAO Y;NISHIMURA M; MURAYAMA K;KURANOBU N;TOJO S;BEPPU M; ISHIGE T; ITOGA S; TSUCHIDA S; MORI M; TAKAYANAGI M;YOKOYAMA M; YAMAGATA K;KISHITA Y;OKAZAKI Y;NOMURA F;MATSUSHITA K; TANAKA T . **A simple method for sequencing the whole human mitochondrial genome directly from samples and its application to genetic testing.** *Sci Rep*. 2019 Nov 22;9(1):17411.

YU-WAI-MAN, C;SMITH, F.E;FIRBANK, M.J; GUTHRIE, G; GUTHRIE, S; GORMAN, G.S; TAYLOR, R.W; TURNBULL, D.M; GRIFFITHS, P.G; BLAMIRE, A.M; CHINNERY, P.F; YU-WAI-MAN, P. **Extraocular muscle atrophy and central nervous system involvement in chronic progressive external ophthalmoplegia.** *PLoS One*, 2013.

APÊNDICES

HOSPITAL GETÚLIO VARGAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise Molecular de Alterações Moleculares do DNA Mitocondrial na Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva

Pesquisador: José Pereira de Moura neto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 13495819.0.3001.5613

Instituição Proponente: Hospital Getúlio Vargas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.588.446

Apresentação do Projeto:

trata-se de estudo descritivo de famílias de pacientes diagnosticados com Oftalmoplegia Externa Progressiva, descrita como uma Miopatia Mitocondrial.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL:

- Determinar alterações genéticas e marcadores laboratoriais do DNA mitocondrial em uma família com pacientes portadores da Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Coletar dados demográficos, clínicos, hematológicos e bioquímicos de cada membro da família;
- Rastrear mutações específicas para miopatia mitocondrial em cada membro da família;
- Estimar a patogenidade das mutações específicas encontradas com a clínica de cada membro da família;

Endereço: FREI SERAFIM, 2352

Bairro: CENTRO

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)3221-5704

CEP: 64.001-020

E-mail: c.arquimedes@uol.com.br



HOSPITAL GETÚLIO VARGAS



Continuação do Parecer: 3.598.448

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresenta os riscos da coleta, manipulação da amostra e confidencialidade dos dados e os meios de minimizá-los ou evitá-los.

Benefícios:

Contribuir com o conhecimento científico na área da saúde. Acesso ao aconselhamento e informações sobre sua doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo de pesquisa relevante na área da Neurologia e pesquisa molecular e genética

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta os termos de apresentação obrigatória

Recomendações:

Apropriar-se da Resolução 466/2012 que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo de Pesquisa aprovado em reunião extraordinária do CEP do HGV

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Termo_Assentimento_Miopatia_Corrigido.doc	26/06/2019 17:27:02	José Pereira de Moura neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel_Menor_de_Idade_Miopatia_Corrigido.doc	26/06/2019 17:26:47	José Pereira de Moura neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Maior_de_Idade_Miopatia_Corrigido.doc	26/06/2019 17:26:37	José Pereira de Moura neto	Aceito
Outros	Resposta_Parecer_CEP_Miopatia.doc	26/06/2019 17:25:43	José Pereira de Moura neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_Miopatia_Corrigido.doc	26/06/2019 17:24:51	José Pereira de Moura neto	Aceito

Endereço: FREI SERAFIM, 2352

Bairro: CENTRO

CEP: 64.001-020

UF: PI

Município: TERESINA

Telefone: (86)3221-5704

E-mail: c.arquimedes@ufpi.com.br

HOSPITAL GETÚLIO VARGAS



Continuação do Parecer: 3.593.445

Investigador	Projeto_Miopatia_Corrigido.doc	26/06/2019 17:24:51	José Pereira de Moura neto	Aceito
Outros	Biorepositorio_José_Pereira_Moura_Neto.docx	26/06/2019 17:23:30	José Pereira de Moura neto	Aceito
Outros	Questionario_Miopatia.doc	30/04/2019 12:17:32	José Pereira de Moura neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Maior_de_Idade_Miopatia.doc	30/04/2019 12:16:26	José Pereira de Moura neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Responsavel_Menor_de_Idade_Miopatia.doc	30/04/2019 12:16:15	José Pereira de Moura neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_ASSENTIMENTO_Miopatia.doc	30/04/2019 12:16:03	José Pereira de Moura neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Miopatia.doc	30/04/2019 12:15:47	José Pereira de Moura neto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

TERESINA, 20 de Setembro de 2019

Assinado por:
Arquimedes Cavalcante Cardoso
(Coordenador(a))

Endereço: FREI SERAFIM, 2352
Bairro: CENTRO CEP: 64.001-000
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3221-5704 E-mail: c.arquimedes@ufpi.com.br

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL”**

A sua participação no projeto já foi autorizada por seus pais no desenvolvimento dessa pesquisa.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Ao participar desta pesquisa, será coletada uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

Você terá acesso aos resultados das amostras de sangue que forem coletadas e utilizadas na pesquisa, após os mesmos serão enviados para o seu endereço pelos correios ou entregues pessoalmente pelo pesquisador deste projeto.

Os dados obtidos por meio do seu prontuário médico serão anexados ao projeto, sem haver necessidade de novas entrevistas, bem como dados hematológicos e bioquímicos de possíveis recoletas de sangue que realizará caso seja acompanhado por médico do hospital ou de posto de saúde. Reitero que os dados hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, não será necessário recoletar seu sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico.

BENEFÍCIOS

Mesmo diante dos avanços da ciência não existe tratamento para qualquer doença genética. Sendo a sua participação de inteira contribuição para o conhecimento científico na área da saúde.

Através das informações contidas no diagnóstico você poderá receber benefícios de aconselhamento e orientação sobre a doença mitocondrial não sendo portador, ou seja, se for negativo para o estudo genético.

A sua participação e das demais pessoas envolvidas serão de extrema importância para um melhor acompanhamento e tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético adequado.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

As suas informações serão mantidas em confidencialidade. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) autorizar. Sua amostra poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo. Você receberá uma via deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEPUFAM) localizado Escola de Enfermagem de Manaus - Sala 07 - Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus – AM- Fone: (92) 3305-1181 Ramal 2004 / (92) 9171-2496. O **Comitê de Ética em Pesquisa - CEP** - é um colegiado independente existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde). As atribuições do **CEP** são de papel consultivo e educativo, visando contribuir para a qualidade das pesquisas, bem como a valorização do pesquisador, que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada.

O **CEP/UFAM** é uma comissão constituída por treze membros das várias áreas do conhecimento, e um representante dos usuários, que tem por finalidade a avaliação da

pesquisa com seres humanos em nossa Instituição, em conformidade com a legislação brasileira regulamentada pela CONEP.

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Mouro Neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular – Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM - Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200. Bairro Coroado I - Manaus-AM-Brasil - Contato: (92) 3305-000 – (92) 98187-0920.

Dr. Emerson Silva Lima- Laboratório de Atividade Biológica, 1o Andar- Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM - Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200. Bairro Coroado I - Manaus-AM-Brasil Tel: (092) 988177360 / (092) 3305 1181 Ramal 2007 - CEP 69077-000

Ana Carla Dantas Ferreira – Pesquisadora - Mestranda - Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM - Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200. Bairro Coroado I - Manaus-AM-Brasil – Contato: (92)994173718

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu _____ aceito participar da pesquisa **“INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL”**

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
RESPONSÁVEL MENOR DE IDADE**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL”**

Está sendo realizada uma pesquisa para o conhecimento sobre a instabilidade do genoma mitocondrial em pacientes com diagnóstico com miopatia mitocondrial.

A motivação para este estudo é principalmente devido à complexidade quanto ao estudo sobre a doença e sua variedade genética em que as mutações comprometem o complexo metabólico do indivíduo. As miopatias mitocondriais caracterizam-se de desordens que podem implicar em anormalidades dos órgãos e a manifestação de fenótipos variáveis nos indivíduos. Acometem principalmente o sistema nervoso central e os músculos. O material genético analisado durante o estudo tem relação com a miopatia mitocondrial apresentada pelo quadro diagnóstico. Demonstrando que a disfunção mitocondrial se deve a deleções do DNA mitocondrial, resultando as mutações e o comprometimento da qualidade de vida do paciente. É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) Sua participação é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá qualquer prejuízo para seu atendimento no serviço caso não queira participar da pesquisa;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Ao participar desta pesquisa, será coletada uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

Você terá acesso aos resultados das amostras de sangue que forem coletadas e utilizadas na pesquisa, após os mesmos serão enviados para o seu endereço pelos correios ou entregues pessoalmente pelo pesquisador deste projeto.

Os dados obtidos por meio do seu prontuário médico serão anexados ao projeto, sem haver necessidade de novas entrevistas, bem como dados hematológicos e bioquímicos de possíveis recoletas de sangue que realizará caso seja acompanhado por médico do hospital ou de posto de saúde. Reitero que os dados hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, não será necessário recoletar seu sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico.

BENEFÍCIOS

Mesmo diante dos avanços da ciência não existe tratamento para qualquer doença genética. Sendo a sua participação de inteira contribuição para o conhecimento científico na área da saúde.

Através das informações contidas no diagnóstico você poderá receber benefícios de aconselhamento e orientação sobre a doença mitocondrial não sendo portador, ou seja, se for negativo para o estudo genético.

A sua participação e das demais pessoas envolvidas serão de extrema importância para um melhor acompanhamento e tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético adequado.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

As suas informações serão mantidas em confidencialidade. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) autorizar. Sua amostra poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo. Você receberá uma via deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMACIONAL TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **“INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL”** Está sendo realizada uma pesquisa para o conhecimento sobre a instabilidade do genoma mitocondrial em pacientes com diagnóstico com miopatia mitocondrial.

A motivação para este estudo é principalmente devido à complexidade quanto ao estudo sobre a doença e sua variedade genética em que as mutações comprometem o complexo metabólico do indivíduo. As miopatias mitocondriais caracterizam-se de desordens que podem implicar em anormalidades dos órgãos e a manifestação de fenótipos variáveis nos indivíduos. Acometem principalmente o sistema nervoso central e os músculos. O material genético analisado durante o estudo tem relação com a miopatia mitocondrial apresentada pelo quadro diagnóstico. Demonstrando que a disfunção mitocondrial se deve a deleções do DNA mitocondrial, resultando as mutações e o comprometimento da qualidade de vida do paciente.

É de grande importância que você entenda os princípios gerais que se seguem e que serão aplicados a todos os participantes do nosso estudo:

- A) Sua participação é totalmente voluntária;
- B) Você poderá interromper sua participação antes ou em qualquer momento do estudo. Sua recusa em participar não envolverá qualquer prejuízo para seu atendimento no serviço caso não queira participar da pesquisa;
- C) Depois de lidas as explicações, você pode fazer qualquer pergunta necessária ao seu entendimento.

EXPLICAÇÃO BREVE SOBRE O PROJETO

Ao participar desta pesquisa, será coletada uma amostra de sangue da veia do braço (mais ou menos uma colher de chá) com seringa e agulha. Durante a coleta de sangue você poderá sentir leve dor ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada após a coleta. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por pessoal bastante treinado.

Você terá acesso aos resultados das amostras de sangue que forem coletadas e utilizadas na pesquisa, após os mesmos serão enviados para o seu endereço pelos correios ou entregues pessoalmente pelo pesquisador deste projeto.

Os dados obtidos por meio do seu prontuário médico serão anexados ao projeto, sem haver necessidade de novas entrevistas, bem como dados hematológicos e bioquímicos de possíveis recoletas de sangue que realizará caso seja acompanhado por médico do hospital ou de posto de saúde. Reitero que os dados hematológicos e bioquímicos posteriores para cada momento de seu retorno, não será necessário recoletar seu sangue, uma vez que pegaremos os dados que constarão no prontuário médico.

BENEFÍCIOS

Mesmo diante dos avanços da ciência não existe tratamento para qualquer doença genética. Sendo a sua participação de inteira contribuição para o conhecimento científico na área da saúde.

Através das informações contidas no diagnóstico você poderá receber benefícios de aconselhamento e orientação sobre a doença mitocondrial não sendo portador, ou seja, se for negativo para o estudo genético.

A sua participação e das demais pessoas envolvidas serão de extrema importância para um melhor acompanhamento e tratamento, uma vez que possibilitará a realização do acompanhamento clínico, laboratorial e aconselhamento genético adequado.

COMPROMISSO COM A CONFIDENCIALIDADE DA IDENTIDADE DO VOLUNTÁRIO

As suas informações serão mantidas em confidencialidade. Os seus dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Deste modo você tem garantia de que este estudo está sendo realizado sob rigorosos princípios científicos e éticos. Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento dos participantes do projeto e do médico que o acompanha.

ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O material coletado (amostra de sangue) será armazenado por até 10 anos somente se o Sr(a) autorizar. Sua amostra poderá ser utilizado em estudos posteriores desde que autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas ou, caso necessário, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e pelo responsável por esta pesquisa atual.

Por isso, pedimos que o Sr(a). se manifeste abaixo sobre o armazenamento e uso da sua amostra de sangue em estudos posteriores.

Não, a minha amostra não deverá ser armazenada.

Sim, concordo que a minha amostra seja armazenada e utilizada em estudos posteriores. Se concordar com o armazenamento da amostra de sangue, pedimos que se manifeste abaixo sobre a necessidade de ser consultado para cada nova pesquisa com a sua amostra e seus dados:

Não quero ser consultado, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Sim, exijo ser consultado para autorizar o uso de minha amostra no novo projeto de pesquisa.

Também em caso de concordar com o armazenamento da sua amostra de sangue, e não exigir ser consultado em estudos posteriores, é possível ainda que sua identidade seja desvinculada dos seus dados e da amostra de sangue, sendo substituídos por códigos, o que aumentaria a segurança de seu anonimato. Porém, a decisão de desvincular a sua identidade da amostra significa que em todos os estudos posteriores onde a sua amostra será utilizada não será possível relacionar os resultados à sua pessoa e assim o Sr.(a) não teria os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

Assim, pedimos que se manifeste sobre a desvinculação de sua identidade da amostra de sangue e dados:

Não, a minha identidade não pode ser desvinculada da amostra e dados

Sim, concordo que minha identidade seja desvinculada da amostra e dados, mesmo sabendo que assim não terei os possíveis benefícios dos resultados do novo projeto de pesquisa.

O pesquisador responsável por este estudo, Prof. Dr. **JOSÉ PEREIRA DE MOURA NETO**, está à sua disposição e com ele você pode esclarecer qualquer dúvida que surja sobre o referido estudo. Você receberá uma via deste TCLE, que será assinada pela pesquisadora e pelo Sr(a) em todas as páginas.

Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEPUFAM) localizado Escola de Enfermagem de Manaus - Sala 07 - Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus – AM- Fone: (92) 3305-1181 Ramal 2004 / (92) 9171-2496. O **Comitê de Ética em Pesquisa - CEP** - é um colegiado independente existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil. Ele foi criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde). As atribuições do **CEP** são de papel consultivo e educativo, visando contribuir para a qualidade das pesquisas, bem como a valorização do pesquisador, que recebe o reconhecimento de que sua proposta é eticamente adequada.

O **CEP/UFAM** é uma comissão constituída por treze membros das várias áreas do conhecimento, e um representante dos usuários, que tem por finalidade a avaliação da pesquisa com seres humanos em nossa Instituição, em conformidade com a legislação brasileira regulamentada pela CONEP.

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos.

Dr. José Pereira de Mouro Neto - Coordenador do projeto - Laboratório de Análises Especializadas em Biologia Molecular – Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM - Av.

Dr. Emerson Silva Lima- Laboratório de Atividade Biológica, 1o Andar- Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM -

Ana Carla Dantas Ferreira – Pesquisadora - Mestranda - Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM -

Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Eu _____ aceito participar da pesquisa “**INSTABILIDADE DO DNA MITOCONDRIAL NA OFTALMOPLÉGIA EXTERNA CRÔNICA PROGRESSIVA: ESTUDO FAMILIAL**”. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Li este termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa. Assinei duas vias, uma que vai ficar comigo e outra que será guardada pelo pesquisador.

Local, Data (dia/mês/ano)

Assinatura do participante do Estudo

Nome do Coordenador da pesquisa: **José Pereira de Moura Neto**

Assinatura do Coordenador da pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Questionário sobre Miopatia Mitocondrial (Oftalmoplegia Externa Crônica Progressiva)

Data da Entrevista:	
Rg:	CPF:

1. DADOS PESSOAIS

Nome:	
Endereço:	
Contato:	Profissão:
Filiação:	
Possui irmãos? Quantos?	
Responsável:	

2. INFORMAÇÕES GERAIS

Possui laudo da Miopatia Mitocondrial? ___ SIM ___ NÃO

Qual?

Realiza algum tratamento experimental? ___ SIM ___ NÃO

Quais?

Realiza reabilitação no tratamento da doença? ___ SIM ___ NÃO

Hidroterapia? ___ SIM ___ NÃO ___ ÀS VEZES

Fisioterapia? ___SIM ___NÃO ___ ÀS VEZES

Já esteve internado antes? ___ SIM ___NÃO

Se sim qual o motivo e há quanto tempo?

Com quantos anos teve a primeira manifestação da doença?

Relato dos primeiros sintomas:

Toma Medicamentos: ___ SIM ___NÃO

Quais: _____

MATERIAL DE CONSUMO

ITENS CUSTEIO			
Materiais	Qtd unitária	Valor unitário	Valor total
Ponteiras amarelas 200 ul, marca VWR (1000 Unds)	20	42,50	850,00
Ponteiras com barreira 200 ul (10 raques com 96 Unds)	20	68,10	1362,00
Microtubo PCR 200µl tampa chata transparente (1000 Unds). Uso nas Análises Hematológicas, Bioquímicas e Moleculares	15	65,00	975,00
Microtubo Eppendorf, 1,5ml, Fundo Cônico, Axygen (1000 Unds). Uso nas Análises Hematológicas, Bioquímicas e Moleculares	09	86,00	774,00
Água livre de RNase DNase (1L) Análises de Biologia Molecular	03	193,00	579,00
Agarose (500g) para corrida eletroforética para as análises de Biologia Molecular	01	650,00	650,00
Acrilamida - 250g para corrida eletroforética para as análises de Biologia Molecular	04	397,00	1588,0
Bis-Acrilamida - 25g para corrida eletroforética para as análises de Biologia Molecular	01	180,00	180,00
Tampão TAE, 50x concentrado – 500 ml corrida eletroforética para as análises de Biologia Molecular	08	58,00	464,00
Tampão TBE, 10x concentrado – 500 ml corrida eletroforética para as análises de Biologia Molecular	08	59,00	472,00
TRIZOL - Reagente para extração de ácidos nucleicos – 100ml - Extração do DNA	10	460,00	4600,00
Marcador de peso molecular 100pb – 100U Corrida eletroforética para as análises de Biologia Molecular	03	317,00	951,00
Enzimas de Restrição para técnica de RFLP-PCR corte para a técnica de Biologia Molecular PCR-RFLP	12	680,00	8020,00
Oligonucleotídeos sintéticos para PCR (Primers) - análises de Biologia Molecular	30	320,00	960,00
Kit Big Dye 3.1	01	4750,00	4750,00
Taq DNA polimerase 500 U (5U/µl) - Análises de Biologia Molecular	30	120,00	3600,00
dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 mM dNTP - análises de Biologia Molecular pela Técnica de PCR	10	420,00	4200,00
TOTAL			R\$ 34.975,00

EQUIPE CIENTÍFICA

Seq.	Nome	Responsabilidades no projeto
01	José Pereira de Moura Neto	Orientador
02	Ana Carla Dantas Ferreira	Mestranda
03	Emerson Silva Lima	Coorientador
04	Adolfo José da Mota	Colaborador
05	Rafael de Oliveira Brito	Análises Práticas e Moleculares
06	Natália Santos Ferreira	Coleta e Práticas Laboratoriais
07	Aline Sampaio Jamel	Coleta e Práticas Laboratoriais
08	Lizandra Menescal	Análises Moleculares
09	Fernanda Cozendey Anselmo	Análises Moleculares
10	Felipe Luz Torres Silva	Coleta e Práticas Laboratoriais
11	Francisca Juçara Cavalcante de Aragão	Coleta e Práticas Laboratoriais