



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

José Miguel Ferreira Coelho Dias

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A Disfunção Mitocondrial nas Doenças Raras”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Ana Sofia Jerónimo, da Dra. Margarida Brenha e do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

José Miguel Ferreira Coelho Dias

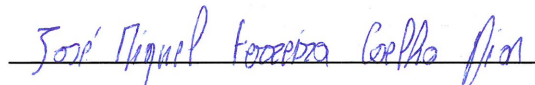
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A Disfunção Mitocondrial nas Doenças Raras”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Ana Sofia Jerónimo, da Dra. Margarida Brenha e do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2020

Eu, José Miguel Ferreira Coelho Dias, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015225582, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “A Disfunção Mitocondrial nas Doenças Raras” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 8 de outubro de 2020.



(José Miguel Ferreira Coelho Dias)

Agradecimentos

Em qualquer projeto da nossa vida as pessoas que nos acompanham são essenciais no contributo que nos possam dar para que o sucesso seja alcançado. Assim, e porque em momentos diferentes tiveram a sua importância, não posso deixar de agradecer:

A todos os professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e em especial ao Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, pela orientação, conhecimento partilhado, total disponibilidade e colaboração.

À minha família, em especial aos meus pais, José e Elizabete, à minha irmã, Beatriz e aos meus avós, Filipe e Irene pelo enorme esforço, incentivo dado durante esta etapa da minha vida, pelos seus ensinamentos e especialmente por sempre confiarem nas minhas capacidades.

À minha querida amiga e companheira Joana Santiago, não só pela grande ajuda prestada ao longo de todo o percurso, mas também pelo apoio incondicional, força, alegria e motivação que me incentivou a concluir este projeto. Agradeço igualmente por todas as suas valiosas críticas e sugestões de trabalho. Aos seus pais, Sérgio e Paula, por toda a compreensão, aconselhamento, ajuda e amizade durante o meu percurso académico.

Aos meus colegas de curso, que foram uma peça fundamental na integração e conclusão deste ciclo, com um especial agradecimento ao Marcos Pereira por todo o companheirismo e amizade.

Aos meus amigos de longa data pela força que sempre me transmitiram para concluir este projeto com sucesso e pela compreensão da minha ausência em certos momentos.

Índice

Agradecimentos	3
Capítulo I - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica	
Lista de Abreviaturas	7
1. Introdução	8
2. Análise SWOT	9
2.1 Pontos Fortes	9
2.1.1 Integração na equipa do BD.....	9
2.1.2 Formação interna e material de trabalho	10
2.1.3 Tarefas desenvolvidas.....	10
2.2 Pontos Fracos	10
2.2.1 Duração do estágio.....	10
2.2.2 Falta de formação académica.....	11
2.3 Oportunidades.....	11
2.3.1 Experiência em indústria farmacêutica	11
2.3.2 Aquisição de conhecimentos	11
2.3.3 Experiência em Teletrabalho	11
2.4 Ameaças.....	12
2.4.1 COVID-19.....	12
3. Considerações Finais	12
4. Bibliografia.....	12
Capítulo II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária	
Lista de Abreviaturas	14
1. Introdução	15
2. Análise SWOT	16
2.1 Pontos Fortes	16
2.1.1 Integração na equipa e partilha de conhecimentos	16
2.1.2 Infraestruturas da Farmácia.....	17
2.1.3 Consolidação de conhecimentos adquiridos no MICF.....	17
2.2 Pontos Fracos	17
2.2.1 Aconselhamento de produtos de saúde e bem-estar	17
2.2.2 Associação entre os princípios ativos aos nomes comerciais dos medicamentos.....	18
2.3 Oportunidades.....	18
2.3.1 Sifarma®	18
2.3.2 Farmácia Nogueira Janeiro	18
2.4 Ameaças.....	19
2.4.1 COVID-19.....	19
3. Caso Clínico	19
4. Considerações Finais	19
5. Bibliografia.....	20
Capítulo III - Monografia “A Disfunção Mitocondrial nas Doenças Raras”	
Resumo.....	22

Abstract	23
Lista de Abreviaturas	24
Lista de Figuras	24
1. Introdução	25
2. Mitocôndria e produção energética	26
Fosforilação oxidativa	26
Produção de espécies reativas de oxigênio	27
3. Disfunção mitocondrial	29
4. Genética mitocondrial	30
5. Neuropatia ótica hereditária de Leber	32
Genética mitocondrial e neuropatia de Leber	33
6. Terapêutica	35
6.1 Brimonidina	35
6.2 Análogos da Ubiquinona	36
6.2.1 Idebenona.....	36
6.2.2 EPI – 743.....	36
6.3 Terapia génica	37
6.4 Aconselhamento	37
7. Conclusão	39
8. Bibliografia	40

Capítulo I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica



Sob a orientação da Dra. Ana Sofia Jerónimo

Lista de Abreviaturas

BD – *Business Development*

Bluepharma – Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.

SWOT – *Strenghts, Wheaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

O estágio curricular é parte integrante do plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Assim, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra possibilita aos seus estudantes a realização de um estágio curricular durante um período de seis meses, que deverão ser divididos entre a Farmácia Comunitária e outra área do ramo farmacêutico.

De acordo com o meu interesse, candidatei-me a um estágio na área da Indústria Farmacêutica, na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., onde fui aceite no departamento de *Business Development* (BD).

A Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. é uma empresa farmacêutica de capital português pertencente ao Grupo Bluepharma, que se encontra estrategicamente localizada em São Martinho do Bispo, Coimbra. Em 2018, a Bluepharma exportou cerca de 87% da sua produção interna para 40 países do mundo inteiro. Atualmente, a empresa cobre os principais mercados farmacêuticos mundiais. Entre as principais áreas de atividade desta empresa destacam-se a produção de medicamentos de marca própria e para terceiros, a investigação de novas tecnologias na área da saúde, o desenvolvimento e registo de medicamentos, assim como a comercialização de medicamentos genéricos.

Com vista a um contínuo desenvolvimento técnico-científico da empresa, a Bluepharma possui diversas parcerias com centros de investigação nacionais e internacionais, destacando-se a ligação à Universidade de Coimbra e aos seus centros de investigação.

Neste estágio de três meses, foi-me dada a possibilidade de aprender e dar apoio a todos os elementos da equipa do departamento do BD. O BD possui diversas atividades, das quais se destaca o desenvolvimento de relações bilaterais com empresas e/ou distribuidores farmacêuticos nacionais e internacionais, criar oportunidades de negócio para serviços de investigação, desenvolvimento e de fabrico de produto por contrato e promover o licenciamento e transferência de tecnologia desenvolvida pela Bluepharma, estabelecendo acordos licenciamento e distribuição com empresas de todo o mundo.

Este estágio apresentou-se-me como uma oportunidade de aplicar conhecimentos teóricos adquiridos durante a frequência do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Para além disto, permitiu-me ainda a interiorização de conhecimentos fora do domínio farmacêutico, como manuseamento de sistemas informáticos e potenciar conhecimentos na área comercial e negocial relacionada com o medicamento.

O presente relatório apresenta-se na forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), em que é dado realce aos pontos fortes e fracos, bem como oportunidades de melhoria e potenciais ameaças deste estágio.

Tabela I – Análise SWOT do Estágio Curricular em Indústria Farmacêutica

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none"> - Integração na equipa do BD - Formação interna e material de trabalho - Tarefas desenvolvidas 	<ul style="list-style-type: none"> - Duração do estágio - Falta de formação académica
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"> - Experiência em Indústria Farmacêutica - Aquisição de conhecimentos - Experiência em Teletrabalho 	<ul style="list-style-type: none"> - COVID-19

2. Análise SWOT

A análise SWOT será a ferramenta de avaliação do estágio curricular desenvolvido na Bluepharma entre 6 de janeiro e 31 de março do presente ano civil. Nesta avaliação, serão detalhados os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*) do estágio, bem como as potenciais oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Integração na equipa do BD

A equipa do BD da Bluepharma é uma equipa jovem, dinâmica e multidisciplinar que procura sempre aprofundar o seu conhecimento acerca dos assuntos que envolvem o medicamento. Aquando da minha entrada para esta equipa, os colegas e a responsável de departamento rapidamente procederam à minha integração. Foi também muito importante para a minha adaptação a disponibilidade de todos os colegas em esclarecer as minhas dúvidas. Esta equipa reúne-se todos os dias sem falta para uma troca de ideias relativamente aos diversos temas relacionados com as tarefas de cada elemento, avaliação de objetivos,

designação de tarefas a executar, e demais temas relevantes para as suas atividades com o auxílio da metodologia *Kaizen*.

2.1.2 Formação interna e material de trabalho

A Bluepharma possibilita aos seus estagiários a presença em formações internas que são lecionadas para os seus colaboradores. Estas formações são uma ferramenta muito importante para que os estagiários consigam fazer a ligação entre os conhecimentos adquiridos na faculdade e a realidade da indústria farmacêutica.

Para além disto foi-me facultado, desde o primeiro dia, um computador portátil da empresa para que eu pudesse exercer todas as atividades durante este estágio.

2.1.3 Tarefas desenvolvidas

O estágio na Bluepharma permitiu-me, numa primeira fase, adquirir conhecimentos básicos para posteriormente serem aplicados nas mais diversificadas tarefas que executei ao longo deste estágio.

No decorrer deste período desenvolvi pesquisas para mercados de interesse da Bluepharma, com o objetivo de aprofundar o conhecimento interno acerca dos mesmos.

Para além disto, adquiri também diversos conhecimentos que me permitiram efetuar propostas comerciais em vários modelos de negócio, efetuar adendas a contratos e preparar contratos. Estes conhecimentos foram aplicados por mim na execução de cotações para clientes e parceiros da Bluepharma.

Assim, este estágio foi ao encontro das minhas expectativas e permitiu-me desenvolver atividades bastante importantes para a minha aprendizagem.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Duração do estágio

O estágio curricular em indústria farmacêutica tem de ser efetuado por um período mínimo de 280 horas. Efetivamente, este é um período curto para aquisição de conhecimentos e desenvolvimento de tarefas e projetos nesta área de tanta importância para as ciências farmacêuticas.

Assim, embora compreenda a importância do estágio em farmácia comunitária, considero este período de estágio consideravelmente curto em comparação com o período de estágio na farmácia comunitária (810 horas).

2.2.2 Falta de formação académica

A realização deste estágio curricular desafiou-me na execução de algumas tarefas para as quais considere que teria sido necessário mais formação académica, nomeadamente no que diz respeito aos mecanismos de proteção de propriedade intelectual.

A interpretação dos mecanismos de proteção de propriedade intelectual é bastante importante para a execução de determinadas tarefas na área do desenvolvimento de negócio, pelo que considero que teria sido vantajoso ter adquirido mais conhecimentos acerca deste tema no decorrer do MICE.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Experiência em indústria farmacêutica

Este estágio ofereceu-me a oportunidade de contactar com a realidade da indústria farmacêutica e perceber toda a atividade da indústria desde a produção do medicamento até à chegada à farmácia e dispensa ao utente.

Neste contexto, esta colaboração com a Bluepharma foi realmente enriquecedora para mim, pois pude aprender e desenvolver conhecimentos numa área que vai de encontro às minhas preferências.

2.3.2 Aquisição de conhecimentos

No decorrer deste estágio foram diárias as aprendizagens que realizei não só junto de todos os membros da equipa do BD da Bluepharma no decorrer das tarefas que executei, mas também através das formações internas ministradas por membros de outros departamentos da Bluepharma. O período de estágio foi realmente importante para a aquisição de conhecimentos informáticos e negociais relacionados com a atividade da Bluepharma enquanto indústria farmacêutica.

2.3.3 Experiência em Teletrabalho

A pandemia causada pelo Coronavírus fez com que eu tivesse contacto com a realidade do teletrabalho. Esta experiência foi completamente nova para mim, mas ao mesmo tempo bastante enriquecedora para o meu estágio na Bluepharma e a minha aprendizagem, na medida em que aprofundei e desenvolvi novos conhecimentos e metodologias que auxiliam o teletrabalho.

2.4 Ameaças

2.4.1 COVID-19

A pandemia que se instalou no nosso país fez com que a Administração da Bluepharma decidisse que o departamento do BD da Bluepharma passasse a executar as suas atividades diárias através do regime de teletrabalho a partir do dia 11 de março. Efetivamente, esta pandemia impediu que fossem ministradas mais formações por parte dos colaboradores da Bluepharma, pelo que considero uma ameaça ao meu estágio.

3. Considerações Finais

As atividades desenvolvidas ao longo do estágio no departamento do BD da Bluepharma foram fundamentais para a minha formação, tendo ido de encontro aos meus interesses pessoais e profissionais.

Consegui vivenciar experiências nunca antes vividas, contactar com pessoas novas, ferramentas de trabalho diferenciadas e um ambiente de trabalho bastante agradável. Este contacto com a Indústria Farmacêutica permitiu-me aplicar conhecimentos adquiridos no MICF e adquirir novas valências importantes para exercer esta atividade.

Efetivamente, este estágio foi bastante útil pelo que compreendi as atividades realizadas neste departamento em específico e na empresa em geral. Para além disto, consegui adquirir outra perspetiva sobre a indústria farmacêutica e os diversos mercados farmacêuticos.

Assim, considero que este estágio foi bastante enriquecedor a todos os níveis.

O meu sincero obrigado a todos.

4. Bibliografia

BLUEPHARMA – Grupo Bluepharma. [Acedido a 1 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>

Capítulo II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Sob a orientação da Dra. Margarida Brenha

Lista de Abreviaturas

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT – *Strenghts, Wheaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

Na sequência da Unidade de Estágio Curricular do quinto ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, realizei entre os meses de maio e setembro de 2020, um estágio curricular em farmácia comunitária, na Farmácia Janeiro, onde tive a oportunidade de adquirir conhecimentos e competências necessárias para executar a atividade profissional de farmacêutico.

Efetivamente, a Farmácia Comunitária é o primeiro local que os utentes recorrem em questões de saúde, reconhecendo-lhe proximidade, confiança, dedicação e competência profissional (Ordem dos Farmacêuticos, 2020). A Farmácia Janeiro é um exemplo claro do que é uma Farmácia Comunitária para os utentes e a para a sua população em geral.

A escolha desta farmácia para a realização do estágio deveu-se à boa opinião que a população tem acerca da mesma, tanto pelo atendimento dos profissionais como pelos conhecimentos farmacêuticos que evidenciam. Posto isto, considerei que esta Farmácia se enquadrava nos objetivos que pretendia concretizar aquando da realização do estágio.

A Farmácia Janeiro localiza-se no concelho de Águeda, na freguesia de Trofa, mais concretamente na Mourisca do Vouga. Trata-se não só de uma zona residencial, dado o elevado número de prédios e moradias, como também de uma zona industrial, uma vez que nela abundam escritórios, empresas e restaurantes. Nas proximidades, localiza-se o laboratório de análises clínicas, o Hospital Veterinário do Baixo Vouga, o Consultório Dentário de Augusto Ferreira e, ainda, a extensão de saúde da Mourisca do Vouga. Estes factos ajudam a explicar quer a diversidade de utentes que frequentam a farmácia, em termos de idades e de estratos sociais, quer a presença de um razoável número de clientes habituais e fidelizados. Para além disto, esta farmácia apresenta-se como sendo bastante acessível para os seus utentes, quer estes se desloquem de carro ou a pé.

2. Análise SWOT

A análise SWOT será a ferramenta de avaliação do estágio curricular desenvolvido na Farmácia Janeiro entre 5 de maio e 30 de setembro do presente ano civil. Nesta avaliação, serão detalhados os pontos fortes (*Strengths*), os pontos fracos (*Weaknesses*) do estágio, bem como as potenciais oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

Tabela I – Análise SWOT do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none">- Integração na equipa e partilha de conhecimentos- Infraestruturas da Farmácia- Consolidação de conhecimentos adquiridos no MICF	<ul style="list-style-type: none">- Aconselhamento de produtos de saúde e bem-estar- Associação dos princípios ativos aos nomes comerciais dos medicamentos
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none">- Sifarma®- Farmácia Nogueira Janeiro	<ul style="list-style-type: none">- COVID-19

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Integração na equipa e partilha de conhecimentos

A Farmácia Janeiro apresenta uma equipa composta por uma diretora técnica, duas farmacêuticas e três técnicas de farmácia. É de salientar que esta é uma equipa competente, unida e bastante profissional em que sempre imperou o espírito de ajuda. Desde o início do meu estágio que me forneceram todo o apoio necessário para que me integrasse bem no seio da equipa. Para além disto, a equipa mostrou-se sempre disponível para me auxiliar em qualquer dúvida que surgisse na execução das atividades realizadas ao longo do dia na farmácia.

Neste estágio, tive oportunidade de aprender todas as atividades que são inerentes ao bom funcionamento de uma farmácia, nomeadamente controlo de prazos de validade e *stocks*, devolução de produtos a fornecedores, aprovisionamento e gestão de encomendas, dispensa de medicamentos (sujeitos a receita médica, não sujeitos a receita médica e veterinários) e processamento e faturação do receituário.

2.1.2 Infraestruturas da Farmácia

A Farmácia Janeiro dispõe de infraestruturas remodeladas e modernizadas de modo a oferecer um espaço agradável e confortável seja para o utente seja para as pessoas que trabalham na farmácia. Esta é composta por uma zona de atendimento ao público com seis balcões de atendimento estrategicamente localizados. Os lineares de medicamentos não sujeitos a receita médica e dos produtos veterinários estão situados por detrás dos balcões de atendimento centrais. Existem também outros lineares que estão ao alcance dos utentes, onde figuram os produtos de dermocosmética, higiene e saúde oral. Na retaguarda dos lineares que dão suporte aos balcões de atendimento está também localizado um *robot* que é responsável pelo armazenamento dos medicamentos.

2.1.3 Consolidação de conhecimentos adquiridos no MICF

O estágio realizado na Farmácia Janeiro foi uma etapa importante para a consolidação de conhecimentos adquiridos no MICF, na medida em que consegui passar para a prática os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo dos últimos cinco anos. Com o passar do tempo, fui ganhando mais agilidade e prática na execução das diversas atividades da farmácia, o que me permitiu começar a executar outro tipo de tarefas. Este constante desafio foi crucial para o meu crescimento enquanto futuro farmacêutico.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Aconselhamento de produtos de saúde e bem-estar

Após iniciar o atendimento ao público, uma das maiores dificuldades que enfrentei foi aconselhar adequadamente os produtos de saúde e bem-estar mais adequados para as necessidades dos utentes. Embora, eu tivesse alguma noção de certos produtos, decorrente dos conhecimentos adquiridos no MICF, fui confrontado com uma variedade enorme de produtos de saúde e bem-estar que a farmácia tem disponíveis para venda.

O auxílio de toda a equipa da farmácia foi bastante importante nesta fase para que eu pudesse adquirir e consolidar conhecimentos e, por conseguinte, realizar um bom aconselhamento perante as necessidades de cada utente.

2.2.2 Associação entre os princípios ativos aos nomes comerciais dos medicamentos

No decorrer do atendimento ao público no balcão senti também alguns constrangimentos no que concerne à associação entre os princípios ativos e os nomes comerciais dos medicamentos, decorrente do atendimento de utentes que se dirigiam a mim para dispensar as suas receitas. Este entrave surgiu-me quando os utentes se dirigiam a mim e solicitavam determinado medicamento referindo-se ao seu nome comercial. Contudo, aproveitei as ferramentas que o Sifarma[®] disponibiliza, nomeadamente na pesquisa da medicação que o utente toma através da base de dados para relacionar os princípios ativos com os nomes comerciais dos medicamentos.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Sifarma[®]

No decorrer deste estágio, tive a oportunidade de aprender e realizar, com o sistema informático Sifarma 2000[®], todas as tarefas inerentes ao bom funcionamento da farmácia, desde a compra/entrada de um medicamento na farmácia até à sua venda/saída. Com o decorrer do tempo, surgiu um novo módulo do programa Sifarma[®], módulo esse que tive a oportunidade de conhecer desde o início da sua implementação, na farmácia.

Assim, considero que este estágio me concedeu a oportunidade de trabalhar com os dois módulos do programa Sifarma[®] e, conseqüentemente adquirir conhecimentos que me permitem uma utilização fluída e autónoma destes dois sistemas.

2.3.2 Farmácia Nogueira Janeiro

O estágio realizado na Farmácia Janeiro permitiu-me contactar com duas farmácias pertencentes ao mesmo grupo que, embora bastante semelhantes no seu método e modo de funcionamento, se encontram em localizações diferentes abrangendo, por isso, diferentes tipos de utentes. Esta experiência permitiu-me contactar, ainda que por pouco tempo, com uma realidade diferente e, por conseguinte, adquirir alguma experiência num contexto de trabalho diverso.

2.4 Ameaças

2.4.1 COVID-19

A pandemia que vivemos foi uma clara ameaça ao meu estágio, na medida em que todos os serviços outrora prestados na farmácia, tais como medições de parâmetros fisiológicos e bioquímicos e administração de vacinas e injetáveis se encontram temporariamente cancelados. Este cancelamento foi uma barreira à minha aprendizagem. Para além disso, foi notório que grande parte dos utentes se dirigiam à farmácia apenas para o levantamento de receitas ou compra de medicação estritamente necessária, o que diminuiu a procura de produtos de cosmética e bem-estar.

3. Caso Clínico

Um utente dirigiu-se à farmácia a pedir Xanax[®], pois os seus colegas de curso tinham-lhe dito que este era um ótimo medicamento para tomar nas épocas de exame, devido ao facto de este fármaco melhorar o descanso durante a noite e aumentar a concentração para o estudo no dia seguinte. Após ouvir o utente, informei que não lhe podia dispensar esse medicamento sem receita médica, pois tratava-se de uma Benzodiazepina e que o fármaco em causa podia causar dependência física e psíquica. Para além disto, aconselhei um suplemento vitamínico para reduzir o cansaço físico e psicológico e também aumentar a concentração para o estudo mais intensivo durante a época de exames. O utente mostrou-se surpreso pela informação que lhe dei, compreendeu todos os efeitos adversos da toma de Xanax[®] e decidiu comprar o suplemento vitamínico que aconselhei.

4. Considerações Finais

O estágio realizado em farmácia comunitária, Farmácia Janeiro, revelou-se bastante útil para o meu desenvolvimento enquanto futuro farmacêutico, uma vez que pude compreender a importância que a farmácia tem para os utentes, sendo por vezes, o local escolhido por estes para terem acesso a cuidados e aconselhamentos diferenciados de saúde, depositando na farmácia e na sua equipa bastante confiança.

Adicionalmente, pude colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo dos últimos cinco anos de formação académica e adquirir novos conhecimentos.

Foi nesta farmácia que tive a oportunidade de vivenciar experiências desconhecidas até então e contactar com todas as atividades realizadas numa farmácia comunitária.

Assim, devo destacar todo o carinho, amizade e compreensão da Dra. Margarida Brenha e restante equipa farmacêutica da Farmácia Janeiro, sem exceção.

O meu sincero obrigado a toda a equipa da Farmácia Janeiro.

5. Bibliografia

Infarmed – Resumo das Características do Medicamento [Acedido a 1 de outubro de 2020].
Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

Ordem dos Farmacêuticos – A Farmácia Comunitária. [Acedido a 1 de outubro de 2020].
Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

Capítulo III

Monografia

“A Disfunção Mitocondrial nas Doenças Raras”

Sob a orientação do Professor Doutor José Barata Antunes Custódio

Resumo

A neuropatia hereditária de Leber é uma doença genética mitocondrial rara que se caracteriza por uma diminuição severa da acuidade visual, indolor e bilateral (em 25% dos casos), consequente da degeneração das células ganglionares da retina. Embora esta seja a manifestação mais comum, existem outras patologias associadas a esta neuropatia, tais como, arritmias cardíacas, neuropatias periféricas, distonia e mioclonia, podendo estar ainda associados alguns distúrbios neurológicos.

A neuropatia de Leber afeta maioritariamente indivíduos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 15 e os 30 anos e é apenas transmitida pela herança materna. Embora a discrepância entre sexos seja ainda de causa desconhecida, atualmente são referidos diferentes aspetos como fatores hormonais, exposição ao tabaco, álcool ou até mesmo interferência de certos genes do cromossoma X.

Efetivamente, esta neuropatia é causada por diversas mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) que codifica subunidades do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, sendo as mais comuns a G3460A na subunidade ND1, a G11778A na subunidade ND4 e a T14484C na subunidade ND6. Estas mutações são responsáveis por defeitos na síntese de ATP, excesso de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e apoptose das células ganglionares da retina.

São diversas as abordagens terapêuticas para prevenir a diminuição da acuidade visual bilateral. A utilização de fármacos como a Idebenona, EPI – 743 e Brimonidina e a terapia génica têm demonstrado resultados encorajadores no tratamento desta neuropatia. Para além disto, é fundamental aliar a estas abordagens o aconselhamento ao doente para resultados mais promissores.

Palavras-chave: mitocôndria; disfunção Mitocondrial; doenças raras; mtDNA; neuropatia ótica hereditária de leber.

Abstract

Leber's hereditary neuropathy is a rare mitochondrial genetic disease that is characterized by a severe decrease in visual acuity, painless and bilateral damage (in 25% of cases), resulting from the degeneration of the retinal ganglion cells. Although this is the most frequent manifestation, there are other pathologies associated with this neuropathy, such as cardiac arrhythmias, peripheral neuropathies, dystonia and myoclonus, which may also be associated with some neurological disorders.

Leber's neuropathy mainly affects males, aged between 15 and 30 years and is only transmitted by maternal inheritance. Although the discrepancy between genders is still an unknown cause, actually there are other factors such as hormones, exposure to tobacco, alcohol or even interference from certain X chromosome genes being taken into account.

Effectively, this neuropathy is caused by several mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) that encode complex I subunits of the respiratory mitochondrial chain the most common being the G3460A in ND1 subunit, the G11778A in ND4 subunit and the T11488C in ND6 subunit. These mutations are responsible for defects in the ATP synthesis, overproduction of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis of retinal ganglion cells.

There are diverse therapeutic approaches to prevent the decrease of the bilateral visual acuity. The use of drugs, such as Idebenone, EPI-743 and Brimonidine and the gene therapy have demonstrated encouraging results in the treatment of this neuropathy. In addition, to obtain more promising results it is essential to combine these approaches with advice to the patient.

Keywords: mitochondria; mitochondrial dysfunction; rare diseases; mtDNA; Leber hereditary optic neuropathy.

Lista de Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

GPX – Glutathione peroxidase

MELAS – Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica episódios tipo acidente vascular cerebral

mtDNA – DNA mitocondrial

NARP – Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa

nDNA – DNA nuclear

SOD – Enzima superóxido dismutase

tRNA – RNA transportador

Lista de Figuras

Figura 1 – Fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial

Figura 2 – Produção de ROS

Figura 3 – Representação esquemática do mtDNA

I. Introdução

As doenças raras representam um grande desafio para toda a comunidade médica, científica e para o próprio paciente. Na Europa, as doenças são consideradas raras quando a incidência é inferior a 1 em cada 2 000 pessoas. Nos Estados Unidos, as doenças raras são definidas como patologias que afetam menos de 200 000 cidadãos (Griggs *et al.*, 2009). Estão descritas neste país cerca de 7 000 doenças raras que afetam um total de 25 a 30 milhões de cidadãos americanos (Griggs *et al.*, 2009).

As doenças mitocondriais são consideradas distúrbios raros devido à grande variabilidade de fenótipos e à consequente dificuldade no seu diagnóstico. A disfunção mitocondrial é frequentemente associada a manifestações oftálmicas, tais como retinopatia, distúrbios da motilidade ocular ou neuropatia ótica (Meyerson *et al.*, 2015).

A doença mitocondrial mais comum, causada por uma mutação no DNA mitocondrial (mtDNA), é a neuropatia ótica de Leber (Molnar and Kovacs, 2018). Esta neuropatia é uma doença mitocondrial neurodegenerativa, que foi descrita pela primeira vez em 1871 pelo oftalmologista alemão Theodore Leber (Wan *et al.*, 2016), sendo causada por mutações no mtDNA e podendo ser apenas transmitida através da herança mitocondrial materna. Mais especificamente, esta neuropatia é causada por mutações pontuais que afetam a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A neuropatia de Leber perturba, de um modo geral, jovens adultos, causando incapacidade num dos olhos para focar a imagem visualizada, seguidos de sintomas semelhantes no outro.

2. Mitocôndria e produção energética

As mitocôndrias são organelos intracelulares de membrana dupla que estão presentes no citoplasma das células eucariotas, sendo responsáveis pela produção de energia essencial para as etapas bioquímicas que regulam a homeostase celular (Meyerson *et al.*, 2015). Para além da produção de ATP, as mitocôndrias intervêm na manutenção da homeostase dos níveis de cálcio, produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), regulação da apoptose e termorregulação (Sousa *et al.*, 2014).

A função primária da mitocôndria é gerar a energia necessária, sob a forma de ATP, para o funcionamento normal das células eucariotas através de produtos resultantes da glicólise, proteólise e lipólise. O ATP é gerado através do sistema fosforilativo, que usa a energia produzida na cadeia respiratória mitocondrial na forma de potencial de membrana e gradiente de pH (Clay *et al.*, 2011). O número de mitocôndrias presente em determinado tipo de células depende das necessidades energéticas das mesmas. Células metabolicamente ativas, tais como as células ganglionares da retina, possuem um número elevado de mitocôndrias. Por isso, estas células são bastante suscetíveis de serem afetadas por disfunções mitocondriais (DiMauro and Schon, 2003).

Fosforilação oxidativa

Como supramencionado, a maioria da energia necessária para o funcionamento celular é produzida pela mitocôndria por processos de fosforilação oxidativa. Este processo é realizado por cinco diferentes complexos proteicos, sendo eles: complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase); complexo II (succinato ubiquinona Oxidoreductase); complexo III (ubiquinona citocromo c oxidoreductase); complexo IV (citocromo c oxidase); complexo V (ATP sintase). Para ajudar neste processo participam ainda dois transportadores de eletrões, o coenzima Q e o citocromo c que transferem os eletrões entre os complexos da cadeia respiratória (Fig.1) (DiMauro and Schon, 2003).

O processo inicia-se com a transferência de eletrões, da oxidação do NADH e FADH₂ provenientes das vias metabólicas para os complexos I e II respetivamente. O coenzima Q executa o transporte de eletrões do complexo I e do II para o complexo III e o citocromo c transfere os eletrões do complexo III para o IV. O complexo IV reduz o oxigénio molecular, com a formação de água (Meyer *et al.*, 2019). O fluxo de eletrões entre os complexos produz energia necessária para que os complexos I, III e IV efetuem o bombeamento de protões, contra o gradiente de concentração, para o espaço intermembranar (Fig.1).

O complexo V é o último dos complexos que intervêm no processo de fosforilação oxidativa. Utiliza a energia obtida pelos prótons acumulados no espaço intermembranar para que estes regressem à matriz mitocondrial, promovendo a fosforilação do ADP e do fosfato inorgânico em ATP. Este complexo, nos mamíferos, é composto por duas unidades funcionais, F_0 hidrofóbico e F_1 hidrofílico, estando por isso o primeiro integrado na membrana e o segundo, mais periférico, em contacto com a matriz (Vizarrra et al., 2009). O componente F_0 é responsável pelo movimento dos prótons através do complexo V, fundamental para a atividade mesmo. A taxa da respiração mitocondrial depende da disponibilidade de ADP no citoplasma. A adenina translocase de nucleótidos regula este mecanismo já que é responsável pelo transporte de ADP para a matriz e ATP para o citosol para processos dependentes de energia, mantendo assim o gradiente de ADP/ATP através membrana interna (Navarro and Boveris, 2007).

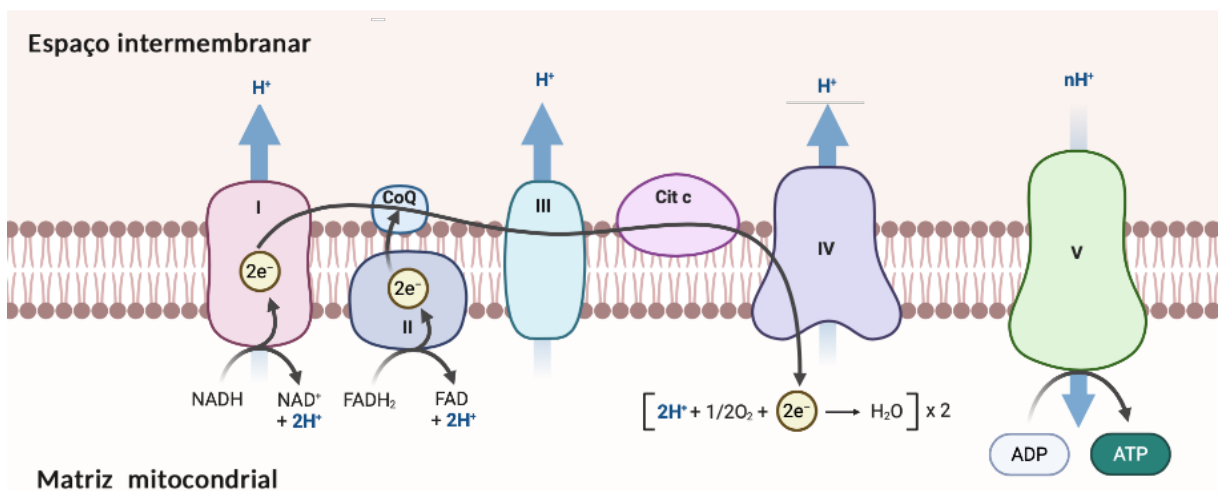


Figura 1. Fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial. O processo tem início com a cedência de eletrões do NADH e $FADH_2$ para o complexo I e II, respetivamente. Seguidamente, os eletrões são transferidos do complexo I e do complexo II para o III pela coenzima Q e deste para o IV através do citocromo c. Os complexos I, III e IV bombeiam os prótons para o espaço intermembranar aumentando a concentração de prótons neste espaço. O retorno dos prótons para a matriz mitocondrial através do complexo V ativa este que fosforila o ADP a ATP.

Produção de espécies reativas de oxigénio

O processo de fosforilação oxidativa gera também radicais livres de oxigénio, que são designadas por espécies reativas de oxigénio (ROS) (Fig.2). Estas espécies são altamente instáveis e podem danificar diferentes estruturas celulares, tais como lípidos, proteínas e hidratos de carbono. As formas mais comuns de ROS são o anião superóxido, peróxido de hidrogénio e o radical hidroxilo. A concentração destas espécies é bastante importante para

a manutenção da homeostase celular e tradução de sinais celulares (Lanciano *et al.*, 2013). Um aumento dos níveis de ROS está relacionado com danos oxidativos crónicos, induzindo a morte celular e neurotoxicidade (Uttara *et al.*, 2009).

A fuga de eletrões da cadeia respiratória mitocondrial ocorre principalmente no complexo I e III, onde o complexo I liberta eletrões para a matriz mitocondrial, ao passo que o complexo III liberta eletrões em ambos os lados da membrana (Hroudová and Fišar, 2013).

Este abandono de eletrões faz com que o oxigénio molecular seja reduzido, dando origem ao superóxido, que se transforma em anião superóxido em ambiente aquoso. O anião superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogénio (numa reação catalisada pela enzima superóxido dismutase) que depois pode seguir duas vias, a reação de Fenton ou ser reduzido a água (Bertero and Maack, 2018).

A reação de Fenton tem como catalisador o ião ferroso e dá origem ao radical hidroxilo. Por sua vez, a glutathione peroxidase é responsável pela transformação do peróxido de hidrogénio em água (Fig.2) (Zorov *et al.*, 2014).

Existem também outras fontes de ROS na mitocôndria, tais como a monoamino oxidase, que cataboliza as monoaminas produzindo peróxido de hidrogénio e a α -cetoglutarato desidrogenase, que produz peróxido de hidrogénio quando o rácio de NADH e NAD⁺ é elevado (Hroudová and Fišar, 2013). As ROS são neutralizadas pelo sistema antioxidante, que é composto por várias enzimas, tais como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione transferase. Para além destas enzimas, existem também outras moléculas antioxidantes, tais como a coenzima Q10, creatina e o tocoferol (Sousa *et al.*, 2014).

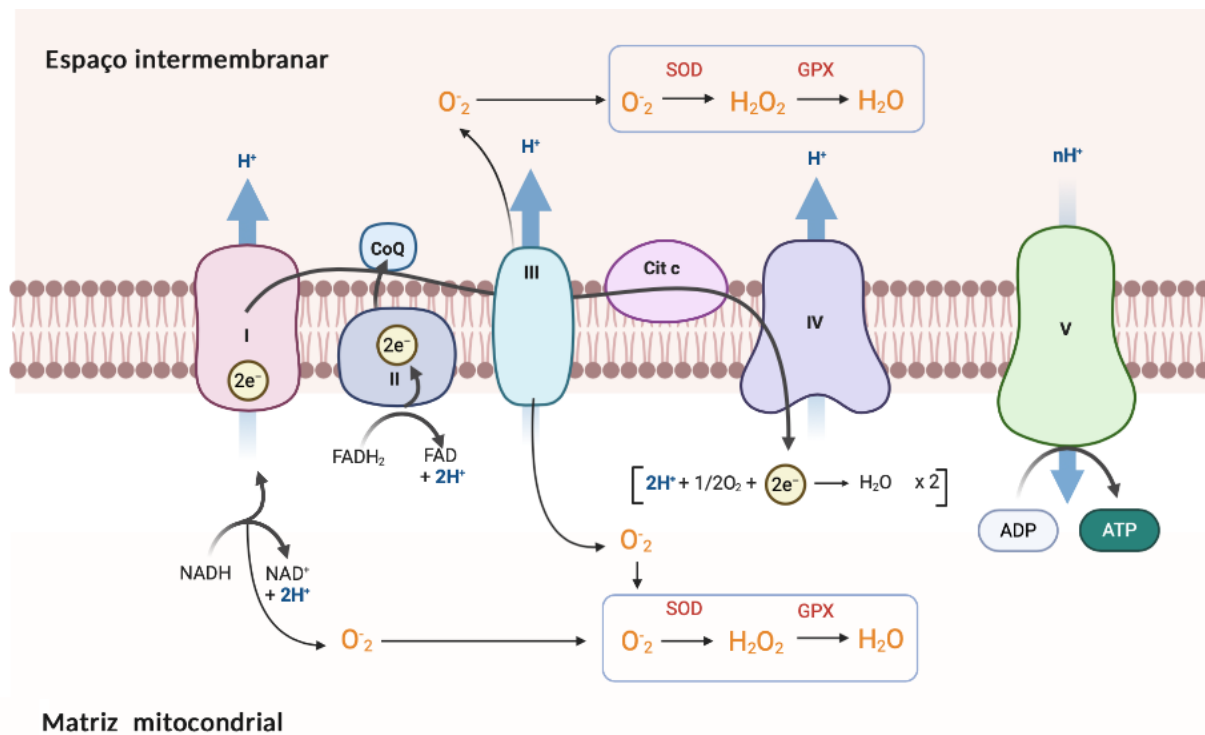


Figura 2. Produção de ROS. A perda de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial ocorre principalmente no complexo I e III, onde o complexo I liberta elétrons para a matriz mitocondrial, ao passo que o complexo III liberta elétrons em ambos os lados da membrana. Esta fuga de elétrons faz com que o oxigênio molecular seja reduzido, dando origem ao anião superóxido em ambiente aquoso. Este anião é convertido em peróxido de hidrogênio (numa reação catalisada pela enzima superóxido dismutase - SOD) que depois pode seguir duas vias, a reação de Fenton ou ser reduzido a água. A reação de Fenton tem como catalisador o íon ferroso e dá origem ao radical hidroxilo. Por sua vez, a glutatona peroxidase (GPX) é responsável pela transformação do H_2O_2 em H_2O .

3. Disfunção mitocondrial

A alteração ou deficiência das funções celulares normais está frequentemente associada à disfunção mitocondrial (Yaribeygi *et al.*, 2019). Os distúrbios mitocondriais representam um grande desafio para a medicina. A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear (nDNA), enquanto que apenas uma fração reduzida de proteínas é codificada pelo mtDNA. As mutações dos genes do mtDNA ou nDNA podem originar uma série de alterações no funcionamento normal da mitocôndria, tais como, produção de ROS em excesso, desregulação da homeostase dos níveis de cálcio, desregulação do processo de apoptose e produção insuficiente de energia. A disfunção mitocondrial pode afetar uma grande variedade de órgãos, constituindo a causa de várias patologias, nomeadamente cancro e doenças neurodegenerativas. Contudo, existem situações em que apenas um único órgão é afetado, como na neuropatia ótica hereditária de Leber (Molnar and Kovacks, 2018).

A disfunção mitocondrial pode aumentar a produção de ROS, sobrecarregar os mecanismos celulares antioxidantes e, por conseguinte, causar stress oxidativo (Ames et al., 1993).

As neuropatias óticas são uma causa importante de deficiência visual crônica, tendo em comum a degeneração dos axónios das células ganglionares da retina, que formam o nervo ótico (Pascolini and Mariotti, 2012). A neuropatia ótica hereditária de Leber é uma das neuropatias óticas hereditárias mais comuns, estando diretamente relacionada com a disfunção mitocondrial (Lopez Sanchez et al., 2016).

4. Genética mitocondrial

A maioria das proteínas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa e noutras atividades e funções da mitocôndria são codificadas no núcleo, sintetizadas no citosol e transportadas para o interior do organelo (Calvo and Mootha, 2010).

O mtDNA tem 16 569 pares de bases e codifica 13 subunidades proteicas que compõem os complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Este DNA é exclusivamente transmitido através da herança materna e replica-se continuamente. Na maioria dos casos é verificada a homoplasmia que traduz a presença de uma única forma de mtDNA numa célula, seja normal ou mutado, ou seja, a sequência de mtDNA copiada é idêntica à original. No entanto, existem bastantes casos de heteroplasmia, designando a condição em que numa célula coexistem mtDNA normal e mtDNA mutado, que podem resultar da ineficiência dos mecanismos de reparação do mtDNA, do ambiente oxidativo na matriz mitocondrial ou da constante replicação do DNA no organelo, aumentando a probabilidade de haver mutações no mtDNA replicado. Deste modo, a heteroplasmia está associada a uma variedade de doenças (Wallace and Chalkia, 2013).

O nDNA codifica cerca de 1000 proteínas mitocondriais, proteínas do sistema de fosforilação oxidativa, proteínas constituintes da membrana mitocondrial e proteínas envolvidas na manutenção do mtDNA. As mutações no nDNA podem causar uma série de doenças e síndromes, tais como o Síndrome de Leigh, a doença de Tooth-Marie-Charcot e o síndrome de Mohr-Tranebjaerg (Molnar and Kovacs, 2018).

Existem cerca de 330 mutações pontuais patogénicas identificadas no mtDNA humano, estando ainda em investigação o aparecimento dessas mutações e as suas consequências. Muitas dessas mutações, causadoras de disfunções mitocondriais estão associadas a encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios tipo acidente vascular cerebral, vulgarmente conhecidos por síndrome de MELAS, neuropatia ótica de Leber, Síndrome de

NARP (neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa) e ainda Síndrome de Leigh. A neuropatia de Leber foi a primeira a ser descrita e é também a mais prevalente das doenças mitocondriais. As mutações mais comuns associadas a esta doença são: G3460A na subunidade NDI, G11778A na subunidade ND4 e T14484C na subunidade ND6 (Fig.3). No entanto, existem ainda outras mutações pontuais relacionadas com deficiências severas do complexo I, sendo elas a G14459A ou G14600A, ambas na subunidade ND6 (Fig.3). Esta neuropatia está associada a deficiências no complexo I, com produção reduzida de ATP, aumento da permeabilidade mitocondrial e da produção de ROS (Nissanka and Moraes, 2018).

A Síndrome de NARP é uma disfunção mitocondrial comumente relacionada com a mutação pontual T8993G/C encontrada na subunidade ATP6 (Fig.3). A doença de MELAS (Fig.3), responsável por miopatia mitocondrial, encefalomiopatia, acidose láctica e episódios de acidente vascular cerebral, é causada, em 80% dos casos por uma mutação pontual no gene mitocondrial RNA transportador (tRNA) representada por A3243G. A Síndrome de Leigh (Fig.3) é a única doença mitocondrial que associa mutações tanto no mtDNA como nDNA. As mutações associadas a esta doença encontram-se em genes relacionados com os complexos I, IV e V, bem como em tRNAs. A maioria das mutações estão associadas ao complexo I (G3697A na subunidade NDI, T10191C na ND3 e G13513A na ND5) mas existem algumas relacionadas com a ATPase6, sendo elas T8993G/C e T9176C. Por fim, são conhecidas ainda 3 doenças multissistémicas associadas a largas deleções de mtDNA, tais como o Síndrome de Pearson, oftalmoplegia crónica externa progressiva e Síndrome de Kearns (Nissanka and Moraes, 2018).

Para desenvolver um sinal clínico, a proporção de moléculas de mtDNA mutado deve exceder um determinado limiar, que é variável de tecido para tecido e que é influenciado por combinações de formas mutadas e polimorfismos do mtDNA e do nDNA (Molnar and Kovacks, 2018).

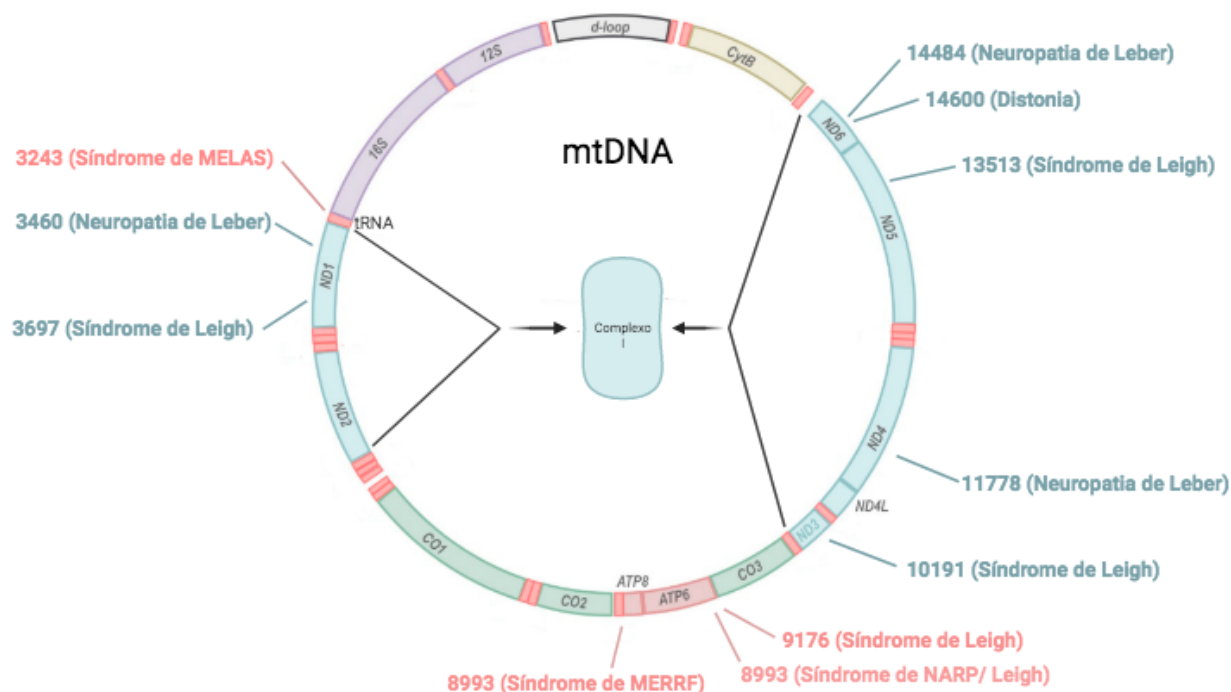


Figura 3. Representação esquemática do mtDNA. O mtDNA possui 16 569 pares de bases e codifica 13 subunidades proteicas que compõem os complexos da cadeia respiratória mitocondrial. As mutações pontuais identificadas no mtDNA humano são causadoras de disfunções mitocondriais que estão associadas a síndrome de MELAS, neuropatia ótica de Leber, Síndrome de NARP e ainda Síndrome de Leigh.

5. Neuropatia ótica hereditária de Leber

A neuropatia de Leber foi a primeira doença associada a uma mutação pontual no mtDNA e é transmitida exclusivamente pela herança genética materna (Meyerson *et al.*, 2015). Esta neuropatia caracteriza-se pela perda da capacidade da visão central causada pela degeneração das células ganglionares da retina, que são bastante sensíveis à disfunção mitocondrial e a alterações metabólicas. Aproximadamente 25% dos casos de doentes com a neuropatia apresentam perda da capacidade de visão bilateral (Newman, 2005).

O feixe papilo-macular é composto por células ganglionares da retina responsáveis pela visão central, possui fibras de pequeno diâmetro e é bastante dependente da mitocôndria, pelo que é bastante afetado em caso de disfunção mitocondrial. Segundo um estudo realizado em murganhos com mtDNA mutado, que desenvolveram sinais clínicos da neuropatia tais como degeneração do feixe papilo-macular, inflamação axonal e mitocôndrias dismórficas nos feixes de axónios desmielinizados das células ganglionares da retina, foi evidenciado que a produção de ROS tem um papel predominante no desenvolvimento de sinais clínicos, em detrimento da deficiente produção de ATP (Lin *et al.*, 2012).

Cerca de 95% dos indivíduos afetados com esta neuropatia perdem a visão antes dos 50 anos. A percentagem de doentes com manifestações da neuropatia de Leber entre os 70 e 80 anos é bastante reduzida (Dimitriadis *et al.*, 2014).

Estudos epidemiológicos indicam que a perda da capacidade de visão associada a uma mutação pontual no mtDNA afeta 1 em cada 31000 cidadãos do norte do Reino Unido, 1 em cada 39000 na Holanda e 1 em cada 50000 na Finlândia, afetando em 80 a 90% dos casos indivíduos do sexo masculino. Os sintomas começam normalmente entre os 20 e os 30 anos de idade (Newman, 2005). O consumo de álcool e tabaco, o défice de vitamina B12, bem como a ingestão de medicamentos que afetam a atividade mitocondrial também contribuem para a perda da capacidade de visão em portadores das mutações causadoras da neuropatia. Foi demonstrado, num estudo retrospectivo, a associação potenciadora do tabaco na perda de visão em indivíduos geneticamente predispostos à neuropatia, devido ao comprometimento da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, redução da atividade da citocromo c oxidase (complexo IV) e consequente aumento das ROS causado pelo fumo do cigarro.

Embora a manifestação mais comum da neuropatia de Leber seja a perda da visão unilateral seguida de bilateral, têm sido associadas outras patologias a portadores desta neuropatia, tais como arritmias cardíacas, neuropatias periféricas, distonia e mioclonia (Yu-Wai-Man *et al.*, 2011). Estão também associadas a esta neuropatia alguns distúrbios neurológicos, tais como tremor postural, neuropatia periférica, miopatia inespecífica, distúrbios do movimento e síndrome de Leigh (McFarland *et al.*, 2007).

Genética mitocondrial e neuropatia de Leber

Cerca de 90% dos casos em que a neuropatia se manifesta são causados por mutações pontuais localizadas nos nucleótidos 3460, 11778 e 14484 do mtDNA. A mutação no nucleotídeo 11778 está associada a mais casos e a um pior prognóstico (Yu-Wai-Man *et al.*, 2014). Estas mutações originam deficiências na estrutura das proteínas envolvidas no complexo I (NADH: ubiquinona oxirredutase) da cadeia respiratória mitocondrial, originando um decréscimo na síntese de ATP e um aumento de ROS e *stress* oxidativo (Yu-Wai-Man *et al.*, 2014). As três variantes patogénicas mais comuns designam-se por m.11778 G>A, m.14484 T>C e m.3460 G>A e codificam, respetivamente, a subunidade 4, 6 e I do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. A mutação no nucleótido 11778 é responsável por aproximadamente 70% dos casos em todo o mundo, enquanto a mutação no nucleótido 14484 é mais comum entre os Canadianos (Macmillan *et al.*, 2000) (Yu-Wai-Man *et al.*, 2011).

Efetivamente, os indivíduos com a mutação na posição 14484 apresentam a maior percentagem de recuperação da função visual, contrariamente aos indivíduos com a mutação 11778. A mutação 3460 é a causa de um comprometimento mais acentuado da função visual. As probabilidades de recuperar totalmente a função visual são bastante reduzidas e o risco de desenvolver sintomas é superior em indivíduos do sexo masculino (Yu-Wai-Man and Chinnery, 2016).

A mãe de um indivíduo com a neuropatia geralmente possui a variante patogénica do mtDNA. Na maioria dos casos, existe um histórico de perda visual que afeta os familiares maternos em tenra idade. Um indivíduo do sexo masculino, afetado ou não, que possua uma variante patogénica do mtDNA que causa a neuropatia não pode transmitir a variante a nenhum de seus descendentes. Por outro lado, a mãe que seja portadora da variante patogénica primária do mtDNA transmite a variante a todos os seus filhos. Por esta razão, é importante realizar o diagnóstico pré-natal das variantes patogénicas do mtDNA. No entanto, é bastante difícil obter um resultado verdadeiramente positivo neste teste pré-natal, pois a carga de mtDNA mutado nos amniócitos e nas vilosidades coriônicas pode não ser representativa de um teste positivo. À semelhança dos outros distúrbios mitocondriais, a heteroplasmia influencia a incidência desta neuropatia, na medida em que a segregação replicativa do mtDNA mutante durante a embriogénese é aleatória, originando assim células, tecidos ou órgãos com diferentes percentagens de mtDNA mutado (Yu-Wai-Man and Chinnery, 2016).

Outro fator de risco para a perda da visão é o conjunto de genes herdados que transportam a mutação patogénica do mtDNA. Ao longo da evolução, os polimorfismos do mtDNA agruparam-se, formando os chamados haplogrupos, um conjunto de genes que tendem a ser herdados juntos. Como exemplo disto, temos o caso dos caucasianos, onde o haplogrupo J está associado ao aumento da incidência da mutação 11778 e 14484, enquanto que o haplogrupo K está associado ao aumento da incidência da neuropatia ótica de Leber causada pela mutação 3460. Os portadores chineses que apresentam a mutação 11778 tiveram um risco aumentado de perda da visão quando herdados com o haplogrupo M7b1'2 e um risco diminuído com o haplogrupo M8a (Yanli *et al.*, 2008).

Indivíduos holandeses, australianos e norte-americanos portadores desta neuropatia têm revelado sinais de ataxia, encefalopatia de início juvenil e distúrbios psiquiátricos. Estes fenótipos foram denominados de "neuropatia ótica de Leber plus" e foram associados a outras mutações pontuais no mtDNA que afetam a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (Yu-Wai-Man *et al.*, 2011). Para além disto, a mutação pontual no nucleótido 11778 causadora da neuropatia em estudo tem sido associada a um síndrome desmielinizante

- Síndrome de Harding - que é radiológica e clinicamente idêntica à esclerose múltipla. Esta é uma das hipóteses que sugere que uma resposta imune anormal contra o nervo ótica seja a causa da perda da visão (Meyerson *et al.*, 2015).

6. Terapêutica

O tratamento das disfunções mitocondriais ainda está numa fase muito precoce. Embora existam investigações promissoras em desenvolvimento, ainda não existe uma terapêutica específica e eficaz para doenças com esta etiologia.

A produção de ROS é uma das principais causas das mutações no mtDNA. Logo, a terapêutica com antioxidantes assume uma importância relevante no tratamento desta neuropatia. Além disso, os pacientes são aconselhados a reduzir os fatores de risco ambientais para perda da visão, tais como o tabaco, o consumo excessivo de álcool, medicamentos com toxicidade mitocondrial e exposição a toxinas ambientais (Kirkman *et al.*, 2009). Ao longo dos tempos, têm sido desenvolvidas várias formulações para o tratamento de patologias causadas por disfunções mitocondriais, tais como a coenzima Q10, a L-carnitina, a creatina, o ácido lipóico, a dimetilglicina, a cisteína, o succinato, o dicloroacetato, a vitamina K1, a vitamina K3, a vitamina C, a vitamina B1, a vitamina B2 e a vitamina E (Newman, 2012).

Para os casos com fenótipos associados à “neuropatia de Leber plus”, deve ser efetuada uma avaliação de manifestações extra oculares, tais como eletrocardiograma e vigilância neurológica (Newman, 2012).

A Agência Europeia de Medicamentos, através do Comité de Medicamentos de Uso Humano aprovou no dia 15 de fevereiro de 2007 a Raxone, cujo princípio ativo é a ibedenona na dosagem de 150 mg como medicamento órfão para o tratamento da neuropatia de Leber. Para além da Idbenona, existem outras alternativas terapêuticas, que serão referidas posteriormente, para o tratamento dos sintomas desta neuropatia.

6.1 Brimonidina

A brimonidina é um agonista alfa-2, com capacidade de reduzir a pressão intraocular em casos de glaucoma. A terapêutica com brimonidina pode, portanto, ser potencialmente útil em portadores assintomáticos da neuropatia com glaucoma, devido a seus efeitos de redução da pressão e supostos efeitos neuroprotetores (Meyerson *et al.*, 2015).

6.2 Análogos da Ubiquinona

A ubiquinona é uma molécula presente na membrana mitocondrial que transporta elétrons dos complexos I e II para o complexo III. Como anteriormente referido, a neuropatia de Leber é causada por mutações no mtDNA que afetam o complexo I. Efetivamente, a ubiquinona análoga da coenzima Q10 no estado oxidado, tem uma ação facilitadora do fluxo elétrons, conseguindo aumentar o número de elétrons que atingem o complexo III da cadeia respiratória mitocondrial e reduzir a formação de ROS no complexo I e III (Meyerson *et al.*, 2015).

A Idebenona e EPI-743 são análogos de ubiquinona de cadeia curta que atravessam com facilidade a barreira hematoencefálica e atingem as mitocôndrias, ao contrário da coenzima Q10 (Meyerson *et al.*, 2015).

6.2.1 Idebenona

A idebenona é uma benzoquinona de cadeia curta análoga da coenzima Q10, com capacidade de transferir elétrons diretamente para o complexo III da cadeia respiratória mitocondrial.

Efetivamente, na neuropatia de Leber, a idebenona é capaz de transferir elétrons diretamente para o complexo III da cadeia transportadora de elétrons, ignorando assim o complexo I da cadeia respiratória afetado pelas três mutações principais do mtDNA causadoras da neuropatia de Leber. Através deste mecanismo é capaz de restabelecer a geração de ATP e consequente reativação das células ganglionares da retina inativas em doentes com a neuropatia (Gueven and Faldu, 2013).

6.2.2 EPI – 743

A EPI-743 é uma para-benzoquinona que repõe os níveis de glutatona e possui uma atividade antioxidante muito maior em comparação à idebenona (Peragallo and Newman, 2015). Embora a EPI-743 não seja tão estudada quanto a idebenona, foi realizado um estudo com EPI-743 que incluiu cinco pacientes com a neuropatia diagnosticada há 90 dias. Os resultados demonstraram diminuição e suspensão dos efeitos da doença após o tratamento com EPI-743, durante um mínimo de 1 ano, em quatro dos cinco pacientes testados (Meyerson *et al.*, 2015).

Um outro estudo realizado em dois irmãos portadores da mutação 14484 demonstrou a rápida recuperação da visão após tratamento com EPI-743 (Toledano *et al.*, 2013).

6.3 Terapia génica

A terapia génica tem-se demonstrado promissora para o tratamento de patologias causadas por uma disfunção mitocondrial, nomeadamente para a neuropatia ótica de Leber, pois é muito mais fácil de atingir as células ganglionares da retina. Contudo, um dos grandes obstáculos desta terapia é conseguir que o fármaco atravesse a membrana dupla da mitocôndria (Peragallo and Newman, 2015).

Para contornar as dificuldades de inserção do DNA no genoma mitocondrial, foi desenvolvida a expressão alotópica (expressão de genes que normalmente são expressos apenas no genoma mitocondrial) (Peragallo and Newman, 2015). Desse modo, uma das formas de aplicar a terapia génica é através da transfeção do DNA exógeno no genoma nuclear de uma célula através de um adenovírus. (Bainbridge *et al.*, 2015).

Efetivamente, esta terapia consiste na incorporação de um novo material genético no genoma nuclear, permitindo a expressão das proteínas de interesse. As proteínas codificadas por este material genético previamente inserido podem ser direcionadas para exercerem a sua função na mitocôndria. Esta técnica foi aplicada com sucesso em linhagens celulares híbridas, substituindo a proteína ND4 que foi afetada pela mutação 11778 (Bonnet *et al.*, 2007). Cwerman-Thibault e colaboradores demonstraram a segurança e a eficácia da expressão alotópica do gene ND4 humano de tipo selvagem introduzido por um vetor recombinante de adenovírus, fornecendo evidências adicionais de que a terapia génica através da expressão alotópica em humanos pode constituir uma terapêutica eficaz em doentes com a neuropatia de Leber (Bonnet *et al.*, 2007).

Existe uma alternativa em estudo à terapêutica com recurso à expressão alotópica do gene ND4, que consiste na aplicação de um gene nuclear de levedura que codifica todo o complexo I (NDI1). Esta capacidade do gene NDI1 de codificar todo o complexo I confere a possibilidade de tratamento de todas as mutações causadoras da disfunção do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Contudo, esta terapêutica apresenta mais dificuldades do que a expressão alotópica no que toca à incorporação do material genético nas mitocôndrias, devido à membrana dupla da mitocôndria (Peragallo and Newman, 2015).

6.4 Aconselhamento

Em todas as doenças causadas pela herança genética, o aconselhamento sobre este tipo de patologias, embora não seja um tratamento propriamente dito, deve ser dado ao paciente para que este esteja devidamente informado do risco de desenvolvimento da doença nos seus filhos e parentes (Peragallo and Newman, 2015).

A maioria dos pacientes com a neuropatia de Leber são homoplasmáticos (80-90%), ou seja, todas as mitocôndrias expressam apenas o mtDNA responsável pelo desenvolvimento da patologia. Os homens portadores de uma mutação no mtDNA podem ter certeza de que seus filhos não possuem a mutação. Os filhos de uma mulher com a neuropatia terão todos a mutação. Embora se desconheçam ainda os verdadeiros motivos, a verdade é que os homens portadores de uma mutação patogênica têm até 50% de risco de desenvolver esta neuropatia, enquanto que as mulheres têm um risco de 10% (Yu-Wai-Man *et al.*, 2011). Pensa-se que este evento seja devido a fatores hormonais (Giordiano *et al.*, 2011), exposição a tabaco e álcool (Kirkman *et al.*, 2009) ou até interferência de genes do cromossoma X (Bu and Rotter, 1991) (Yu-Wai-Man *et al.*, 2014).

Em relação aos fatores hormonais tornou-se óbvio que as hormonas sexuais femininas têm um efeito benéfico nesta doença. Mais concretamente, o tratamento com 17 β -estradiol potencia a atividade da enzima superóxido dismutase e reduz a produção de ROS (Giordiano *et al.*, 2011). No que diz respeito aos genes do cromossoma X, realizaram-se análises de segregação a um elevado número de famílias com esta doença. Decorrente desta análise, foi identificada a existência de um gene recessivo ligado ao cromossoma X que atua em sinergia com a mutação do mtDNA, potenciando a perda de visão. Isto justifica a discrepância na ocorrência da neuropatia entre sexos, já que uma doença recessiva ligada ao X tem maior probabilidade de afetar indivíduos do sexo masculino (Bu and Rotter, 1991) (Yu-Wai-Man *et al.*, 2014).

7. Conclusão

A neuropatia ótica de Leber é uma doença genética rara causada por uma disfunção mitocondrial, a qual se caracteriza pela perda da acuidade visual bilateral e cujos sintomas se iniciam, normalmente, entre os 20 e os 30 anos de idade. Para além disto, o consumo de álcool e tabaco, o défice de vitamina B12 e a ingestão de medicamentos que afetam a atividade mitocondrial contribuem para um aparecimento acelerado dos sintomas em indivíduos afetados pela neuropatia.

Efetivamente, a disfunção mitocondrial é causada por mutações pontuais no mtDNA que codificam proteínas do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, sendo estas denominadas por m.11778 G>A, m.144847 T>C e m.3460 G>A.

As referidas mutações originam uma série de alterações no funcionamento da mitocôndria, nomeadamente a produção de quantidades excessivas de ROS, défice bioenergético e consequente degeneração das células ganglionares da retina.

Embora ainda não exista uma terapêutica específica e eficaz para doenças com esta etiologia e sabendo que a produção de ROS é uma das principais causas das mutações no mtDNA, a terapêutica com antioxidantes assume especial relevância no tratamento desta neuropatia.

Com efeito, o arsenal terapêutico é composto por uma abordagem farmacológica e pela terapia génica, de modo a prevenir a diminuição da acuidade visual sem nunca descurar a importância do aconselhamento genético.

8. Bibliografia

- Ames, B., Shigenaga, M., Hagen, T., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7915–7922.
- Bainbridge, J., Mehat, M., Sundaram, V., Robbie, S., Barker, S., Ripamonti, C., Georgiadis, A., Mowat, Beattie, S., Gardner, P., Feathers, K., Luong, V., Yzer, S., Balaggan, K., Viswanathan, A., Ravel, T., Casteels, I., Holder, G., Tyler, N., Fitzke, F., Weleber, R., Nardini, M., Moore, A., Thompson, D., Petersen-Jones, S., Michaelides, M., van den Born, L., Stockman, A., Smith, A., Rubin, G., Ali, R., 2015. Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber's Congenital Amaurosis. *The New England Journal of Medicine* 372, 1887-1897.
- Bertero, E., Maack, C., 2018. Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria. *Circulation Research* 122, 1460-1478.
- Bonnet, C., Kaltimbacher, V., Ellouze, S., Augustin, S., Bénit, P., Forster, V., Rustin, P., Sahel, J., Corral-Debrinski, M., 2007. Allotopic mRNA Localization to the Mitochondrial Surface Rescues Respiratory Chain Defects in Fibroblasts Harboring Mitochondrial DNA Mutations Affecting Complex I or V Subunits. *Rejuvenation Research* 10, 127-144.
- Bu, X., Rotter, J., 1991. X-chromosome-linked and mitochondrial gene-control of Leber hereditary optic neuropathy— evidence from segregation analysis for dependence on X-chromosome inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8198-8202.
- Calvo, S., Mootha, V., 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11, 25-44.
- Clay, H., Sullivan, S., Konradi, C., 2011. Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *International journal of developmental neuroscience* 29, 311-324.
- Chen, C., Wang, D., Li, B., 2016. Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Scientific Reports* 6, 1-10.
- DiMauro, S., Schon, E., 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England Journal of Medicine* 348, 2656-2668.
- Dimitriadis, K., Leonhardt, M., Yu-Wai-Man, P., Kirkman, M., Korsten, A., De Coo, I., Chinnery, P., Klopstock, T., 2014. Leber's hereditary optic neuropathy with late disease onset: clinical and molecular characteristics of 20 patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9, 1-5.

Giordano, C., Montopoli, M., Perli, E., Orlandi, M., Fantin, M., Ross-Cisneros, F., et Caparrotta, L., Martinuzzi, A., Ragazzi, E., Ghelli, A., Sadun, A., d'Amati, G., Carelli, V., 2011. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 134, 220-234.

Griggs, R., Batshaw, M., Dunkle, M., Srivastava, R., Kaye, E., Krischer, J., Nguyen, T., Paulus, K., Merkel, P., 2009. Clinical Research for rare disease: Opportunities, challenges and solutions. *Molecular Genetics and Metabolism* 96, 20-26.

Gueven, N., Faldu, D., 2013. Therapeutic strategies for Leber's hereditary optic neuropathy: A current update. *Intractable & Rare Diseases Research* 2, 130-135.

Hroudová, J. Fišar, Z., 2013 Control mechanism in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Neural Regeneration Research* 8, 363-375.

Ji, Y., Zhang, A., Jia, X., Zhang, Y., Xiao, X., Li, Shiqiang, L., Guo, X., Bandelt, H., Zhang, Q., Yao, Y., 2008. Mitochondrial DNA haplogroups M7b1'2 and M8a affect clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy in Chinese families with the m.11778G – A mutation. *American Journal of Human Genetics* 83, 760-768.

Kirkman, M., Yu-Wai-Man, P., Korsten, A., Leonhardt, M., Dimitriadis K., De Coo, F., Klopstock, T., Chinnery, P., 2009. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain* 132, 2317-2326.

Lanciano, P., Khalfaoui-Hassani, B., Selamoglu, N., Ghelli, A., Rugolo, M., Daldal, F., 2013. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: a bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochimica et biophysica acta* 1827, 1332-1339.

Lin, C., Sharpley, M., Fan, W., Waymire, K., Sadun, A., Carelli, V., Ross-Cisneros, F., Baciou, P., Sung, E., McManus, M., Pan, B., Gil, D., MacGregor, G., Wallace, D., 2012. Mouse mtDNA mutant model of Leber hereditary optic neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 20065-20070.

Lopez Sanchez, M., Crowston, J., Mackey, D., Trounce, I., 2016. Emerging Mitochondrial Therapeutic Targets in Optic Neuropathies. *Pharmacology & Therapeutics* 165, 132-152.

Lupták, M., Hroudova, J., 2019. Important Role of Mitochondria and the Effect of Mood Stabilizers on Mitochondrial Function. *Physiological Research* 68, 3-15.

- Macmillan, C., Johns, T., Fu, K., Shoubridge, E., 2000. Predominance of the T14484C mutation in French-Canadian families with Leber hereditary optic neuropathy is due to a founder effect. *American Journal of Human Genetics* 66, 332-335.
- McFarland, R., Chinnery, P., Blakely, E., Schaefer, A., Morris, A., Foster, S., Tuppen, H., Ramesh, V., Dorman, P., Turnbull, D., Taylor, R., 2007. Homoplasmy, heteroplasmy, and mitochondrial dystonia. *American Academy of Neurology* 69, 911-916.
- Meyer, E., Welchen, E., Carrie, C., 2019. Assembly of the Complexes of the Oxidative Phosphorylation System in Land Plant Mitochondria. *Annual Review of Plant Biology* 70, 23-50.
- Meyerson, C., Stavern, G.V., McClelland, C., 2015. Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Dove Medical Press* 9, 1165-1176.
- Molnar M. J., Kovacs G.G., 2018. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 145. Mitochondrial diseases, Chapter 10. G.G. Kovacs and I. Alafuzoff Editors. 147-155.
- Navarro, A., Boveris, A., 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 292, 670-686.
- Newman, 2005. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *American Journal of Ophthalmology* 140, 517-523.
- Newman, N., 2012. Treatment of hereditary optic neuropathies. *Nature Reviews Neurology* 8, 545-556.
- Nissanka, N., Moraes, C., 2018. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 592, 728-742.
- Peragallo, J., Newman, N., 2015. Is there treatment for Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Current Opinion in Ophthalmology* 26(6), 450-457.
- Punzo, C., Xiong, W., Cepko, C., 2012. Loss of daylight vision in retinal degeneration: Are oxidative stress and metabolic dysregulation to blame? *The Journal of Biological Chemistry* 287,1642-1648.
- Sousa, R., Machado-Vieira R., Zarate, C., Manji, H., 2014. Targeting mitochondrially mediated plasticity to develop improved therapeutics for bipolar disorder. *Expert Opin Ther Targets* 18, 1131-1147.

- Stoller, J., 2018. The Challenge of Rare Diseases. *The American College of Chest Physicians* 153(6), 1309-1314
- Toledano, N., Stoica, B., Saavedra, I., Saenz, S., Conde, E., 2013. Comparing EPI-743 treatment in siblings with Leber's Hereditary Optic Neuropathy mt14484 mutation. *Canadian Journal of Ophthalmology* 48, 130-133.
- Uttara, B., Singh, A., Zamboni, P., Mahajan, R., 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology* 7, 65-74.
- Vizarra, E., Tiranti, V., Zeviani, M., 2009. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 200-211.
- Wallace, D., Chalkia, D., 2013. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, 21-220.
- Wan, X., Pei, H., Zhao, M., Yang, S., Hu, W., He, H., Ma, Si., Zhang, G., Dong, X., Chen, C., Wang, D., Li, B., 2016. Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Scientific Reports* 6.
- Yaribeygi, H., Atkin S.L., Sahebkar A., 2019. Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function. *Journal of Cellular Physiology* 234, 8402-8410.
- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P., Chinnery, P., 2011. Mitochondrial optic neuropathies – disease mechanisms and therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research* 30, 81-114.
- Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P., 2016. Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Gene Reviews*.
- Yu-Wai-Man, P., Votruba, M., Moore, A., Chinnery, P., 2014. Treatment strategies for inherited optic neuropathies: past, present and future. *Eye* 28, 521-537.
- Zorov, D., Juhaszova, M., Sollott, S., 2014. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews* 94, 909-950.