



# REVISTA INTERDISCIPLINAR CIÊNCIAS E SAÚDE

V.4, N.2 - Edição 2017

**Técnicas de substituição do DNA mitocondrial na reprodução humana para profilaxia da síndrome de Leigh**

**Techniques of mitochondrial DNA replacement in human reproduction for prophylaxis of Leigh syndrome**

Aline Coêlho Mendes<sup>1</sup>, Brenda Erika Ribeiro Oliveira<sup>1</sup>, Gabriela Maria Pinheiro Rêgo<sup>1</sup>, Daniela Moura Parente Férrer de Almeida<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmicos do 3º Período de Medicina do Centro Universitário UNINOVAFAPI

<sup>2</sup>Doutora em Biotecnologia – área Imunologia e Biologia Molecular. Docente da disciplina de Genética Médica do Centro Universitário UNINOVAFAPI

Endereço para correspondência: Centro Universitário UNINOVAFAPI, Rua Vitorino Orthiges Fernandes, N° 6123, Uruguaí, Teresina – PI, 64073-505.

E-mail: alinemendes29@yahoo.com.br

## RESUMO

A permuta de material genético nuclear entre células embrionárias aponta uma nova opção reprodutiva assistida para portadores de doenças mitocondriais hereditárias. Mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) ou em genes nucleares envolvidos na função mitocondrial têm sido descritas como causa significativa de distúrbios sistêmicos. Dentre as citopatias mitocondriais mais relevantes, enquadra-se a Síndrome de Leigh (SL), transtorno neuro-degenerativo secundário a deficiências enzimáticas que produz alterações cognitivas e motoras em crianças de idade tenra. A SL pode ser causada por mutações em mais de 75 genes diferentes, sendo mutações no mtDNA a causa primária em 20% dos pacientes acometidos. Dada a carência de tratamentos resolutivos para SL, a atenção de profissionais da área médica e genética têm voltado-se para a prevenção da transmissão da doença através de terapias de substituição gênica em célula germinativas. Nesta revisão, avaliou-se a aplicabilidade das principais técnicas de manipulação de mtDNA no âmbito da reprodução humana assistida, bem como suas repercussões clínicas e éticas.

**Palavras-chave:** DNA mitocondrial, substituição mitocondrial, síndrome de Leigh, reprodução humana.

## ABSTRACT

The exchange of nuclear genetic material between embryos points a novel reproductive option for inherited mitochondrial disease carriers. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or in nuclear genes involved in mitochondrial function have been described as a significant cause of multi-organ diseases. Among the main mitochondrial cytopathies, there is the Leigh Syndrome (LS), a neurodegenerative disturbance secondary to enzymatic dysfunctions that produces cognitive and motor disorders in early childhood. LS can be caused by mutations in over 75 genes, mutations in mtDNA being the primary cause of the disturbance in 20% of the patients. Given the lack of treatments, attention of medical and genetics professionals has focused on prevention of transmission of mitochondrial disease through germline gene replacement therapy. In this review it was evaluated the applicability of the main techniques of mtDNA manipulation in the assisted human reproduction field, as well as their clinical and ethical repercussions.

**Keywords:** mitochondrial DNA, mitochondrial replacement, Leigh syndrome, human reproduction.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, um largo espectro de doenças multissistêmicas associadas a disfunções da mitocôndria, globalmente designadas de citopatias mitocondriais, apresentam uma incidência de 1/5000 indivíduos e podem afetar qualquer órgão ou tecido do organismo. Estas doenças são uma causa comum de mortalidade e/ou morbidade crônica, não estandodisponível, salvo raras exceções, qualquer terapia eficaz. Asdoenças mitocondriais podem ser causadas por defeitos molecularesno genoma mitocondrial, no nuclear, ou em ambos,originando doenças da comunicação intergenômica. Estasdoenças resultam da perda ou instabilidade do DNA mitocondrial(mtDNA) e podem ser devidas quer a deleções múltiplas,quer a depleção do genoma mitocondrial, tendo sido descritosnos últimos anos um vasto número de genes associados a estas patologias (NOGUEIRA; VILARINHO, 2016).

As pessoas afetadas estão presentes em qualquer faixa etária com alguma combinação de danos que se diferenciam na progressão, na frequência e no local, como por exemplo, danos neurológicos(que, por vezes,é fatal), músculo-esquelético, cardíaco, gastrointestinal, renal, oftalmológica e envolvimento audiológico. Não há cura ou terapias aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) para qualquer doença mtDNA, sintoma baseada, embora o manejo clínico pode ser benéfico (FALK; DECHERNEY; KAHN, 2016).

Há vários tipos de doenças relacionadas ao DNA mitocondrial, dentre as quais uma das mais relevantes é a Síndrome de Leigh. Entre as síndromes mais raras, tem-se a síndrome de Kearns-Sayre (SKS), a oftalmoplegia externa crônica progressiva (OECP) e a síndrome de Pearson. As doenças mitocondriais não são tão raras como julgava-se antigamente; sua estimativa de prevalência está entre 10 a 15 casos por 100.000 pessoas (COSTA et al., 2016).

A síndrome de Leigh também é conhecida como encefalomielopatianecrosante subaguda, encefalopatia necrosante de Leigh e encefalomielopatianecrosante de Leigh. É uma doença rara (apesar de apresentar taxas de incidência relativamente altas – 1:36.000 nascidos vivos- se comparada a demais doenças de mtDNA), descrita por Denis Leigh em 1951 (departamento de neuropatologia do Instituto de Psiquiatria, Maudsley Hospital em Londres). É uma enfermidade neurometabólica congênita, que faz parte do grupo das encefalopatias mitocondriais. Sabe-se que a alteração ocorre no metabolismo energético, sendo a principal causa de defeito na fosforilação oxidativa e geração de ATP celular. Existem três tipos de transmissão genética associada a esta síndrome: herança recessiva ligada ao X, mitocondrial e autossômica recessiva.

A compreensão da biologia básica de doença mitocondrial provê uma base para desenvolver tratamentos novos, no âmbito da terapia gênica. Foram empregadas várias estratégias para tentar corrigir o defeito genético subjacente. Isso poderia ser alcançado aumentando o número de DNA mitocondrial normal (*i.e.* saudável) ou removendo DNA mitocondrialmutado. Tratamentos farmacológicos foram usados com graus variados de sucesso, mas nenhuma melhoria clínica consistente foi demonstrada.

No momento, o tratamento de doença mitocondrial é promissor e aponta para a identificação, prevenção e tratamento das complicações. Diante disso, esta pesquisa tem como objetivo buscar na literatura recente as técnicas de manejo de DNA mitocondrial, sua aplicabilidade na profilaxia da Síndrome de Leigh e implicações éticas.

## METODOLOGIA

Este estudo constitui-se de uma revisão sistemática da literatura especializada, realizada entre os meses de março e junho de 2017, no qual realizou-se uma consulta a livros e periódicos presentes na Biblioteca do Centro

Universitário UniNovafapi, e por artigos científicos selecionados através de busca no banco de dados do Scielo e da Bireme, a partir das fontes Medline e Lilacs.

A pesquisa dos artigos foi realizada entre março e junho de 2017. Selecionou-se estudos publicados entre 2012 e 2017. A busca nos bancos de dados foi realizada utilizando-se terminologias cadastradas nos Descritores em Ciências da Saúde, criados pela Biblioteca Virtual em Saúde. As palavras-chave utilizadas na busca foram, em língua portuguesa, “síndrome de Leigh”, “DNA mitocondrial”, “substituição mitocondrial” “reprodução humana” e “fertilização in vitro”, e, no idioma inglês, “Leigh syndrome”, “mitochondrial DNA”, “mitochondrialreplacement “humanreproduction” e “in vitro fertilization”.

Os critérios de inclusão para artigos e estudos encontrados foram a abordagem de técnicas avançadas de manipulação embrionária de mtDNA em óvulos provenientes de portadoras da síndrome de Leigh e o estudo dos impactos, éticos e clínicos, da substituição mitocondrial em células embrionárias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Aspectos clínicos da Síndrome de Leigh

As doenças mitocondriais fazem parte de um conjunto pouco vulgar de problemas clínicos que envolvem tecidos com elevados níveis energéticos, como a retina, cérebro, coração, músculo, fígado e sistemas endócrinos. A nível clínico estas doenças traduzem-se desde fraqueza muscular até doenças infantis letais. Além disso, as disfunções mitocondriais contribuem direta ou indiretamente para a formação de tumores e aceleram processos de envelhecimento (LAUREANO, 2015).

Os casos de síndrome de Leigh foram identificados por mutações no mtDNA, tendo, portanto, uma herança materna. Por outro lado, as mutações no DNA nuclear que afetam a síndrome tem complexa herança autossômica recessiva. A incidência desta síndrome é de 1 em a cada 36.000 nascimentos (CAMACHO-CAMACHO, 2015).

A síndrome de Leigh (SL) representa um transtorno neuro-degenerativo secundário à deficiências enzimáticas, ocasionando alterações de fosforilação oxidativa (OXPHOS), incidindo sobre tecidos de alto requerimento energético como o sistema nervoso, muscular e respiratório. Nela, ocorre degeneração neurológica do encéfalo, da medula espinal e do nervo óptico, acarretando gradualmente em alterações cognitivas e motoras. A SL, descrita pela primeira vez por Denis Archibald Leigh (1916-1998), em 1951, é uma doença rara neurometabólica congênita, sendo parte do grupo das encefalomiopatias mitocondriais que caracterizam-se pela degeneração das substâncias cinzentas (NASCIMENTO; KRUEGER; NEVES, 2013).

No corpo existem tecidos caracterizados pelo alto requisito de metabolismo oxidativo para garantir a obtenção de energia necessária para realizar eficazmente a sua função. Dentre estes tecidos é preponderante sistema nervoso central, em que o gânglio basal caracteriza-se por apresentar uma elevada atividade metabólica, situação que os torna vulnerável ao dano celular. Assim, falhas no metabolismo celular destas estruturas serão refletidas de forma significativa nas funções de controle que executam no corpo (CAMACHO-CAMACHO, 2015).

Os gânglios basais (globuspallidus, putâmen, do núcleo caudado, o núcleo subtalâmico e substantianigra) são acúmulos de corpos neuronais cuja função é controle de arranque primário, amplitude e velocidade de movimentos. Numa criança com síndrome de Leigh, o metabolismo oxidativo e necrose destas estruturas resultam em um movimento defeituoso, por conseguinte, caracterizadas por um déficit motor ou a ativação anormal sistema motor, levando a rigidez, tremor e movimentos involuntários. A diminuição da produção de ATP apresentada nesta síndrome não está limitada aos

danos do sistema nervoso central, as consequências da diminuição de energia estão refletidas nas suas manifestações clínicas da síndrome de Leigh (CAMACHO-CAMACHO, 2015).

### **Técnicas de transferência de DNA mitocondrial na prevenção da Doença de Leigh**

O mtDNA tem seu próprio código genético e contém 37 genes codificando algumas das proteínas envolvidas em cadeia respiratória, a síntese de RNA ribossomal e a transferência necessária para a síntese de proteínas na mitocôndria. A homoplasmia indica que indivíduos normais têm em suas mitocôndrias a mesma informação genética normal. Se, no entanto, ocorrem mutações no genoma mitocondrial, elas podem estar presentes em todas as mitocôndrias, elas são chamadas de homoplasmicas. Porém, se a mesma mutação estiver presente em algumas mitocôndrias, é chamada heteroplasmica. A maioria dos pacientes com doenças mitocondriais têm heteroplasmia, com diferente percentagem de mitocôndrias normal e anormal nos seus tecidos. Portanto, a variabilidade na expressão clínica depende da percentagem de mitocôndrias mutadas. Quando ocorrem manifestações clínicas, em geral, são detectadas uma percentagem superior a 70% de mitocôndrias mutadas (MOYA, 2016).

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas e semiautônomas. O caráter haploide do genoma mitocondrial é devido ao seu modo de herança uniparental materna, de modo que os diferentes tipos de mtDNA são resultantes da ocorrência de mutações. Estas mutações genéticas detectadas no mtDNA ao longo da evolução geram as variações ("polimorfismos") que servem como marcadores de linhagens para identificar a ancestralidade materna e na reconstrução da origem e evolução populacional (OLIVEIRA, 2015).

Um estudo realizado no norte da Inglaterra na tentativa de se obter a incidência de mutações no DNA mitocondrial, demonstrou que a prevalência mínima de mutações de ponto no mtDNA foi de 6,9/100.000 em adultos e de 13,1/100.000 em crianças e adultos. Foi constatado, através de estudos científicos, que as mitocondriopatias apresentam uma ocorrência considerável entre as populações, sendo o erro inato mais frequente no metabolismo, com uma frequência de 1 caso em cada 5.000 a 10.000 nascidos vivos (LAGO, 2015).

Quando é detectado algum tipo de má formação ou alteração mitocondrial, o núcleo saudável de um óvulo de uma mulher que deseja ter filhos é retirado e implantado em outro óvulo (sem o núcleo) de uma doadora que tenha mitocôndrias saudáveis. Depois, esse "novo" óvulo será fertilizado com o esperma do pai biológico (FREDERICK, 2015).

No que diz respeito à descrição da técnica de transferência, deve-se notar que, embora geralmente fala-se sobre uma única tecnologia, a verdade é que já desenvolveram dois procedimentos científicos diferentes para resolver os problemas mitocondriais. Há também um terceiro método viável, pelo menos a partir de um ponto de vista teórico. O primeiro envolve a remoção das mitocôndrias de um óvulo de uma mulher que sofre algum tipo de patologia associada com ele e substituí-lo por mitocôndrias de óvulos extraídos de uma mulher saudável. No segundo caso, o processo envolve a remoção do pronúcleo de um óvulo que apresenta patologias mitocondriais para inserção noutro óvulo enucleado anteriormente (BERIAIN et al., 2016).

Segundo estudo de Beriain et al. (2015), o desenvolvimento de técnicas de substituição mitocondrial envolve, de acordo com seus proponentes, uma maneira muito mais eficiente para atender a essa necessidade clínica, porque não só é desnecessária a constituição de embriões defeituosos, mas também evita que os embriões saudáveis têm de passar por um teste que, em última análise, podem causar problemas graves e até mesmo a destruição.

## Considerações éticas do uso de técnicas de transferência do DNA mitocondrial

Graças ao avanço biotecnológico, a reprodução humana assistida tem possibilitado que diversos casais tenham quadros de infertilidade superados, o que possibilita a procriação e o aumento da prole pelo casal. No entanto, o direito, por falta de interesse legislativo ou mesmo pelo fato de não conseguir acompanhar os fatos sociais, ainda não se posicionou diante das novas questões apresentadas pela fertilização *in vitro*, em especial, a heteróloga. Em fevereiro de 2015, o parlamento Britânico aprovou uma variação da fertilização *in vitro*. Esta nova proposta baseia-se na transferência nuclear de um óvulo cujas mitocôndrias não possuem funcionamento adequado para outro, já sem o núcleo, mas que possui as mitocôndrias saudáveis. Após esse procedimento, o óvulo é fecundado (QUEIROZ; ARAÚJO, 2015).

Alguns institutos fazem considerações éticas, políticas sociais de técnicas inovadoras para prevenção da mortalidade materna e a transmissão de doenças de DNA mitocondrial, em que nos servem para decidir e analisar se e em que condições realizar investigações clínicas iniciais destas doenças em humanos seria eticamente permissível (FALK; DECHERNEY; KAHN, 2016).

Técnicas envolvendo a transferência mitocondrial levantam uma série de questões bioéticas. Em primeiro lugar, o aumento do número de doadores de óvulos seria necessário para conduzir a pesquisa necessária e para aplicação clínica. Foi proposto que, para gerir este aumento, um regulamento que garantam o bem-estar do doador, através de um recrutamento adequado e apoio. Além disso, uma limitação no número de doações por doador, que as protege contra efeitos adversos da hiperestimulação ovariana repetida (GÓMEZ-TATAY; HERNÁNDEZ-ANDREU; AZNAR, 2017).

É importante considerar que nem todas as técnicas utilizadas ou propostas na prevenção de doenças mitocondriais têm as mesmas implicações éticas. Assim, dentro da substituição mitocondrial algumas técnicas atuam sobre o gameta feminino, enquanto outras implicam a destruição de um embrião para cada embrião saudável produzido. Portanto, do ponto de vista ético, considera-se que o primeiro método é mais aconselhável. Esta consideração também é efetiva no caso do uso de substituição mitocondrial para resolver problemas de fertilidade. Além destas diferenças, as evidências de segurança até agora estão longe de ser tranquilizadoras em todos os casos. Além disso, as técnicas de edição de genes não requerem a intervenção de um doador com mitocôndria, o que evita o problema da ligação genética do indivíduo com três pessoas, e com os problemas legais e éticos que isso acarreta (FALK; DECHERNEY; KAHN, 2016).

## CONCLUSÃO

As doenças mitocondriais (DM), por serem consideradas doenças raras, tradicionalmente não eram investigadas cientificamente de maneira sistemática. Um dos exemplos dessas doenças é a Síndrome de Leigh, também conhecida como encefalomiopatia sub-necrotizante, é uma doença hereditária e neurodegenerativa rara. As manifestações clínicas são heterogêneas e geralmente surgem durante a infância.

A gravidade dos sintomas clínicos é frequentemente associada à mtDNA em heteroplasmia. A transferência nuclear experimental, também denominada terapia de reposição mitocondrial, tem se mostrado uma tecnologia eficaz na minimização da transmissão de mtDNA mutada antes da implantação dos embriões. Desta forma, a literatura apresenta as vantagens e desvantagens da técnica de transferência mitocondrial, principalmente no que diz respeito às questões éticas.

Percebe-se que ainda há muito para descobrir sobre a biologia do mtDNA, mais ainda quando a intenção não é tratar pessoas doentes, e sim produzir novos indivíduos *in vitro*.



## REFERÊNCIAS

- BERIAIN, Iñigo De Miguel; MACÍAS, Elena Atienza; ARMAZA, Emilio José Armaza. Some thoughts on the mitochondrial transfer: a new issue for bioethics?. **Acta Bioethica**, v. 22, n. 2, 2016.
- CAMACHO CAMACHO, J. Síndrome de Leigh; la vida en una cadena. **Medicina e Investigación**. 3(1):96---99, 2015.
- COSTA, CONCEIÇÃO DE MARIA et al. Análise das doenças relacionadas ao dna mitocondrial: uma revisão da literatura. **Saúde em Foco**, v. 3, n. 1, p. 107-123, 2016.
- FALK, Marni J.; DECHERNEY, Alan; KAHN, Jeffrey. Técnicas de substituição mitocondriais - Implicações para a Comunidade Clínica. **N Engl J Med**. Mar 24; 374(12): 1103–1106, 2016.
- FREDERICK, Marianne. Prevenção de doenças mitocondriais já é realidade no Reino Unido. **Ciência e Cultura**, v. 67, n. 3, p. 16-17, 2015.
- GÓMEZ-TATAY, Lucía.; HERNÁNDEZ-ANDREU, José M.; AZNAR, Justo. Mitochondrial Modification Techniques and Ethical Issues. **J. Clin. Med**. 6(3), 25, 2017.
- LAGO, Débora Cristina Ferreira. **Variantes do dna mitocondrial e as variações constitucionais do crescimento e puberdade**. 2015. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.
- LAUREANO, João Francisco Martins. Novas abordagens na terapia genética em doenças mitocondriais. 58p. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. 2015,
- MOYA, Graciela. Valoración ética de lasnuevasopcionesreproductivasenlasenfermedadesmitocondriales. **Acta bioethica**, v. 22, n. 2, p. 213-220, 2016.
- NOGUEIRA, Célia; VILARINHO, Laura. Doenças mitocondriais: síndrome da depleção do mtDNA. **Boletim Epidemiológico Observações**, v. 5, p. 25-28, 2016.
- OLIVEIRA, Jéssica Maria Florêncio de. **Análise do DNA mitocondrial de pacientes com mucopolissacaridose tipo IV-A no estado da Paraíba**. 44p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campina Grande - PB, 2015.
- QUEIROZ, Juliane Fernandes; DE ARAUJO, Roberta Grisi Caixeta. Reprodução humana assistida: a transferência nuclear e origem genética. **Percurso Acadêmico**, v. 5, n. 9, p. 13-33, 2015.