

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR**

**NELSON MONTE DE CARVALHO FILHO**

**VARIABILIDADE ALÉLICA E EXPRESSÃO DO GENE ABCA4 EM  
SUJEITOS DIAGNOSTICADOS COM A MACULOPATIA DE  
STARGARDT: ASSOCIAÇÃO COM A FUNÇÃO E ESTRUTURA DA  
RETINA E MORFOLOGIA CELULAR GRANULOCÍTICA**

**BELÉM-PARÁ**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA**  
**CELULAR**

**NELSON MONTE DE CARVALHO FILHO**

**VARIABILIDADE ALÉLICA E EXPRESSÃO DO GENE ABCA4 EM**  
**SUJEITOS DIAGNOSTICADOS COM A MACULOPATIA DE**  
**STARGARDT: ASSOCIAÇÃO COM A FUNÇÃO E ESTRUTURA DA**  
**RETINA E MORFOLOGIA CELULAR GRANULOCÍTICA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (área de concentração Neurociências) da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira**  
**Co-orientador: Prof. Dr. Givago da Silva Souza**

**BELÉM-PARÁ**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Carvalho Filho, Nelson Monte de, 1971-

Variabilidade alélica e expressão do gene abca4 em  
sujeitos diagnosticados com a maculopatia de stargardt:  
associação com a função e estrutura da retina e  
morfologia celular dos neutrófilos / Nelson Monte de  
Carvalho Filho. - 2015.

Orientador: Luiz Carlos de Lima Silveira;

Coorientador: Givago da Silva Souza.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do  
Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa  
de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia  
Celular, Belém, 2015.

1. Olhos - Doenças. 2. Degeneração macular.  
3. Neutrófilos. I. Título.

CDD 22. ed. 617.7

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR**

**NELSON MONTE DE CARVALHO FILHO**

**VARIABILIDADE ALÉLICA E EXPRESSÃO DO GENE ABCA4 EM  
SUJEITOS DIAGNOSTICADOS COM A MACULOPATIA DE  
STARGARDT: ASSOCIAÇÃO COM A FUNÇÃO E ESTRUTURA DA  
RETINA E MORFOLOGIA CELULAR DOS NEUTRÓFILOS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular  
(área de concentração Neurociências) da Universidade Federal do Pará como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Givago da Silva Souza**

**BANCA AVALIADORA**

**Prof. Dr. Alexandre Antonio Marques Rosa – ICS (UFPA)**

**Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha – ICB (UFPA)**

**Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena – ICB (UFPA)**

**BELÉM-PARÁ**

**2015**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular



**ATA DE DEFESA DE TESE PARA O DOUTORADO**

**Programa:** Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

**Área de concentração:** Neurociências

**Candidato:** NELSON MONTE DE CARVALHO FILHO.

**Tema:** “**VARIABILIDADE ALÉLICA E EXPRESSÃO DO GENE ABCA4 EM SUJEITOS DIAGNOSTICADOS COM A MACULOPATIA DE STARGARDT: ASSOCIAÇÃO COM A FUNÇÃO E ESTRUTURA DA RETINA E MORFOLOGIA CELULAR GRANULOCÍTICA.**”

**Data:** 24 de junho de 2015, às 8h.

**Local:** Sala 01 do Núcleo d medicina Tropical.

Após o candidato apresentar os resultados do seu estudo e responder às perguntas dos examinadores, a comissão examinadora reuniu-se e resolveu pela sua:

APROVAÇÃO

REPROVAÇÃO

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrados os trabalhos e esta ata foi assinada por todos os membros da comissão examinadora.

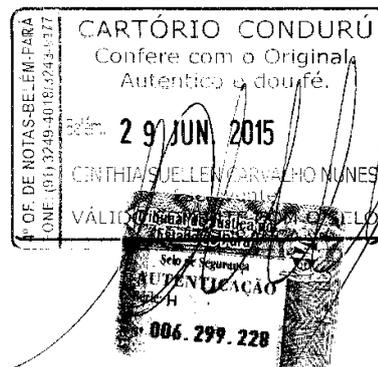
*[Handwritten signature]*  
 Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira – UFPA  
 (Presidente da banca examinadora e orientador, sem direito a voto).

*[Handwritten signature]*  
 Prof. Dr. Givago da Silva Souza, UFPA  
 (Coorientador, sem direito a voto)

*[Handwritten signature]*  
 Prof. Dr. Alexandre Antonio Marques Rosa- UFPA.

*[Handwritten signature]*  
 Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha – UFPA.

*[Handwritten signature]*  
 Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos- UFPA.



## **DEDICATÓRIA**

A minha esposa Samarina por todo amor, paciência, apoio e estímulo sem os quais esta tese jamais teria sido concluída. E, que além de tudo isto ainda me presenteou com a Julia.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira pelas diversas oportunidades de crescimento profissional não somente como seu aluno de doutorado.

Ao Prof. Givago da Silva Souza pelas inestimáveis horas de orientação na condução desta tese.

Ao Prof. Dr. Alexandre Rosa e ao Prof. Dr. Alexandre Lemos pelo estímulo e contribuições para concretização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho nos laboratórios por onde andei e que foram absolutamente essenciais a esta tese, dentre eles: Monique, Caroline, Andreza (HEMOPA), Marquinhos (LGHM), Soraya (LPDNA), Danilo, Juliana, Rodrigo, Izabela (NMT).

Aos meus familiares em especial a minha mãe Enid e irmã Cacá e, meus sogros Claudio e Elizabeth, pela compreensão diante dos longos momentos de ausência.

À Profa. Dra. Edna Ishkawa e a Profa. Dra. Ândrea Kely pela possibilidade do uso dos seus laboratórios para a obtenção de parte dos dados desta tese.

À Profa. Dra. Dora Ventura e Dra. Daniela Bonci pela acolhida no IPUSP durante os primeiros experimentos desta tese.

Aos Drs. Bruno Gomes, Arnaldo Filho e Claudio Teixeira pelo apoio e parceria de sempre.

Ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA pela possibilidade de obtenção deste doutoramento.

## RESUMO

A maculopatia autossômica recessiva de Stargardt se caracteriza pela perda progressiva simétrica da visão na região central do campo visual em indivíduos entre a primeira e segunda décadas de vida. Também fazem parte do diagnóstico clínico a presença de lesões maculares pontuais de coloração amarelo-esbranquiçadas encontradas nas regiões foveal e parafoveal, além da deposição de lipofuscina gerando hipofluorescência e atrofia córiocapilar e do epitélio pigmentado da retina. A acuidade visual dos portadores da degeneração de Stargardt decresce com o seu progresso e tende a se estabilizar entre 20/200 (1,0 logMAR) a 20/400 (1,3 logMAR). Esta tese teve como objetivos a investigação da ocorrência de associações entre as variantes alélicas (mutações) e os níveis de expressão do gene ABCA4 com a morfologia dos granulócitos periféricos e os fenótipos clínicos, eletrofisiológicos e de estrutura da retina em pacientes portadores da maculopatia de Stargardt. Nos onze sujeitos selecionados foram identificadas quatro variantes do tipo não-sinônimas e três do tipo sinônimas. A combinação alélica L1395P/D1817E foi encontrada em 64% dos 22 cromossomos analisados sugerindo a ocorrência do efeito do fundador. Não foi possível a associação entre os genótipos e os fenótipos analisados. Os valores diferenciais de expressão do gene ABCA4 obtidos entre pacientes e grupo controle, bem como a prevalência de neutrófilos bastonados na circulação sanguínea periférica sugerem a possibilidade de servirem como biomarcadores para Stargardt. As imagens retinográficas e angiográficas obtidas permitiram a classificação em estágios I, II e III de comprometimento retiniano nos sujeitos investigados. Os valores de espessura da região central da mácula dos pacientes foram bem menores do que aqueles obtidos para os controles, evidenciando a perda da camada de fotorreceptores. Os achados eletrorretinográficos de campo total em função do tempo de adaptação ao claro possibilitaram a caracterização das perdas funcionais nos sujeitos investigados.

Palavras-chave: Stargardt. Mutações. ABCA4. Eletrorretinografia. Neutrófilos.

## ABSTRACT

The autosomal recessive Stargardt's maculopathy is characterized by symmetrical progressive loss of central vision in patients' first and second decades of life. It is also part of the clinical diagnosis the presence of yellowish-white color specific macular lesions found in the parafoveal and foveal regions, besides lipofuscin deposition generating hypofluorescence and atrophy of choriocapillaris and retinal pigment epithelium. Visual acuity of the Stargardt's degeneration carriers decreases with their progress and tend to stabilize between 20/200 (1.0 logMAR) to 20/400 (1.3 logMAR). This thesis aimed to investigate the occurrence of association between allelic variants (mutations) and ABCA4 gene expression levels with the peripheral granulocytes morphology and clinical phenotypes, electrophysiological and retinal structure in patients harboring Stargardt's maculopathy. Four non-synonymous and three synonymous allelic variants were identified among eleven selected subjects. The allelic combination L1395P/D1817E was found in 64% of the 22 chromosomes analyzed suggesting the occurrence of founder effect. There were no association between genotypes and clinical phenotypes analyzed. The differential values obtained for ABCA4 gene expression between patients and controls, as well as the prevalence of banded neutrophils in the peripheral blood circulation suggest the possibility they could serve as biomarkers for Stargardt. The eye fundus and angiographic images were used for the classification in the stages I, II and III of retinal impairment in subjects investigated. The thickness values of the central region of the macula among patients were much lower than those obtained for the controls, indicating a loss of photoreceptor layer. Full-field electroretinographic findings of light adapted eyes during the course of time enabled the characterization of the functional losses in investigated subjects.

Keywords: Stargardt. Mutations. ABCA4. Electroretinography. Neutrophils.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1	RETINOPATIAS HEREDITÁRIAS	19
1.2	A MACULOPATIA DE STARGARDT	20
<b>1.2.1</b>	<b>Definição e Aspectos Clínicos para o Diagnóstico</b>	<b>20</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Respostas Eletroretinográficas na Maculopatia de Stargardt</b>	<b>24</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Tomografia de Coerência Óptica Retiniana na Maculopatia de Stargardt</b>	<b>26</b>
<b>1.2.4</b>	<b>Epidemiologia da Maculopatia de Stargardt</b>	<b>27</b>
1.3	BIOLOGIA MOLECULAR DA MACULOPATIA DE STARGARDT	28
<b>1.3.1</b>	<b>O Gene Causador da Forma Autossômica Recessiva da Maculopatia de Stargardt</b>	<b>30</b>
<b>1.3.2</b>	<b>A Proteína ABCA4: estrutura e localização</b>	<b>31</b>
<b>1.3.3</b>	<b>O Modelo Preditivo da Maculopatia de Stargardt</b>	<b>36</b>
1.3.3.1	O CICLO VISUAL NOS BASTONETES	38
1.3.3.2	O CICLO VISUAL NOS CONES	41
1.3.3.3	O EFEITO RETINOTÓXICO DOS METABÓLITOS DO CICLO VISUAL E A CONTRIBUIÇÃO DO GENE ABCA4 NA MACULOPATIA DE STARGARDT	43
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>52</b>
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	52
4.2	TIPO DE PESQUISA	52
4.3	SUJEITOS	52
<b>4.3.1</b>	<b>Critérios de Inclusão</b>	<b>53</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Critérios de Exclusão</b>	<b>53</b>
4.4	AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA	53
<b>4.5</b>	<b>Avaliação Oftalmológica Complementar</b>	<b>55</b>

4.5.1	<b>Retinografia e Angiofluoresceínografia</b>	55
4.5.2	<b>Tomografia de Coerência Óptica Retiniana (TCOR)</b>	56
4.5.3	<b>Avaliação do Aumento da Amplitude do Eletrorretinograma de Campo Total em Função do Tempo de Adaptação ao Claro</b>	57
4.6	<b>GENOTIPAGEM</b>	59
4.6.1	<b>Obtenção e quantificação de DNA genômico</b>	60
4.6.2	<b>Amplificação das Regiões Codificantes do Gene ABCA4</b>	60
4.6.3	<b>Purificação e Quantificação dos Amplicons Obtidos</b>	61
4.6.4	<b>Sequenciamento de DNA</b>	62
4.6.5	<b>Edição e Análise dos Éxons do Gene ABCA4</b>	63
4.7	<b>MEDIDAS DE EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ABCA4</b>	63
4.7.1	<b>PCR Quantitativo em Tempo Real (q-rtPCR)</b>	65
4.7.2	<b>Análise da Expressão do Gene ABCA4 por q-rtPCR</b>	66
4.8	<b>AVALIAÇÃO DA SEGMENTAÇÃO NUCLEAR DOS NEUTRÓFILOS</b>	66
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>68</b>
5.1	<b>AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA</b>	68
5.2	<b>RETINOGRAFIAS E AUTOFLUORESCÊNCIA DO OLHO</b>	70
5.3	<b>TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA RETINIANA</b>	75
5.4	<b>A AMPLITUDE DO ELETRORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO AO CLARO: SUJEITOS CONTROLE</b>	77
5.5	<b>A AMPLITUDE DO ELETRORRETINOGRAMA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO AO CLARO: PACIENTES COM STARGARDT</b>	79
5.6	<b>GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO NO GENE ABCA4</b>	85
5.7	<b>EXPRESSÃO GÊNICA DO ABCA4</b>	87
5.8	<b>MORFOLOGIA DOS GRANULÓCITOS</b>	89
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>93</b>
6.1	<b>O ELETRORRETINOGRAMA AO LONGO DA ADAPTAÇÃO AO CLARO COMO MÉTODO INVESTIGATIVO DA FUNÇÃO VISUAL EM PACIENTES COM DOENÇA DE STARGARDT</b>	93

6.2	AS VARIANTES ALÉLICAS DETECTADAS	95
6.3	AS MEDIDAS DE EXPRESSÃO GÊNICA	98
6.4	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS GRANULÓCITOS	99
7	<b>CONCLUSÃO</b>	101
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	102
	ANEXO A	123
	APÊNDICE A	124

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos característicos da maculopatia de Stargardt	21
Figura 2 - Imagens retinográficas representativas dos quatro estágios de evolução clínica em diferentes sujeitos portadores da maculopatia de Stargardt	23
Figura 3 - Organização estrutural linear do transportador ABCA4	32
Figura 4 - Fotorreceptores do tipo cone e bastonete	34
Figura 5 – Estrutura e localização da proteína ABCA4	35
Figura 6 - Esquema proposto para o ciclo visual nos bastonetes	40
Figura 7 - Esquema proposto para o ciclo visual nos cones	42
Figura 8 - Formação do N-ret-PE	44
Figura 9 - Desenho esquemático do modelo de funcionamento para o transportador ABCA4	45
Figura 10 – Desenho esquemático hipotético com a sequência de eventos para o transporte do <i>N</i> -retinilideno-PE ( <i>N</i> -ret-PE) no citoplasma intradiscal dos fotorreceptores	46
Figura 11 - Via metabólica proposta para a formação dos derivados bisretinoides no ciclo visual	47
Figura 12 – Correlação observada entre o tempo de acometimento pela maculopatia de Stargardt e a diminuição da AV	70
Figura 13 - Retinografias (A1 – A2) e angiografias (A3 - A4) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG02 no estágio I	72

Figura 14 - Retinografias (B1 - B2) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG03	72
Figura 15 - Retinografias (C1 - C2) e angiografias (C3 - C4) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG05	73
Figura 16 - Retinografias (D1 - D2) e angiografias (D3 - D4) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG06	74
Figura 17 - Imagens obtidas na tomografia de coerência óptica retiniana	76
Figura 18 - Forma de onda média do eletrorretinograma de campo total do grupo controle	77
Figura 19 - Amplitude média da onda b do eletrorretinograma de campo total do grupo controle	78
Figura 20 - Intervalo entre os percentis 5% e 95% da função de amplitude do eletrorretinograma em função do tempo de adaptação ao claro nos sujeitos controle	79
Figura 21 - Forma de onda do eletrorretinograma de campo total dos pacientes com doença de Stargardt	80
Figura 22 - Comparação das melhores funções ajustadas aos valores de amplitude da onda b dos pacientes de Stargardt	82
Figura 23 – Padrões obtidos para os pacientes fora das curvas de normalidade	83
Figura 24 - Curvas de amplificação para o rt-qPCR nos sujeitos investigados	87
Figura 25 - Gráficos com os valores médios de expressão e demonstrativo global dos níveis de expressão dos genes ABCA4 e ABL nos pacientes e controles	89

Figura 26 - Valores médios do número de neutrófilos em relação aos morfotipos encontrados nos esfregaços sanguíneos	91
Figura 27 – Tipos de mutações encontradas ao longo do quadro de leitura aberta (ORF) do gene ABCA4	92
Figura 28 – Tipos de mutações encontradas ao longo do quadro de leitura aberta (ORF) do gene ABCA4	95

## LISTA DE ABREVIACOES

ABCA4	ATP Binding Cassette da família A, quarta variante
ABCG	ATP Binding Cassette da família G
ABCR	ATP Binding Cassette Retina-specific
AFG	Angiofluoresceínografia
Amáx	Amplitude máxima da função
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATRA	cido trans-retinoico
atRAL	retinal todo-trans
atRE	retinilil éster todo-trans
atROL	retinol todo-trans
AV	Acuidade visual
A2E	N-retinilideno-N-retiniletanolamina
A2GPE	A2-glicerofosfoetanolamina
A2-DHP-PE	A2-dihidropiridina-fosfatidiletanolamina
cDNA	cido Desoxirribonucleico complementar
Cq	Ciclo de quantificao
CRALBP	Proteína Celular Ligante de Retinaldedo
CRBP	Proteína Celular Ligante de Retinol tipo 1
Ct	Ciclo limiar
DNA	cido Desoxirribonucleico
DRH	Distrofias retinianas hereditárias
ECD	Domínio Exocitoplasmtico
EDTA	cido etileno-diamino-tetracético
EPR	Epitélio Pigmentado Retiniano

ERGMf	Eletrorretinograma multifocal
G	Ganho de função
GRCh38.p2	Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRBP	Proteína Interfotorreceptora Ligante de Retinoides
LNT-NMT	Laboratório de Neurologia Tropical do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA
LRAT	Lecitina-retinol aciltransferase
N-ret-PE	N-retinilideno-fosfatidiletanolamina
NBD	Domínio Ligante de Nucleotídeo
OCT	Optical Coherence Tomography
ORF	Open Reading Frame
PCR	Reação em cadeia da polimerase
q-rtPCR	PCR quantitativo em tempo real
RDH	retinol desidrogenase
RNA	ácido ribonucleico
RPE65	Proteína específica do epitélio pigmentado com 65 kDa
SEB	Segmento externo do bastonete
SIB	Segmento interno do bastonete
TAE	tris-ácido bórico-edta
TCO	Tomografia de Coerência Óptica
TCOR	Tomografia de coerência óptica retiniana
TMD	Domínio Transmembranar
T50	Constante de tempo
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta

YAC	Yeast Artificial Chromosome
11cRAL	retinal 11-cis
11cROL	retinol 11-cis
11-cis RE	éster retinil 11-cis
11cisREH	Hidrolase retinil éster 11-cis

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 RETINOPATIAS HEREDITÁRIAS**

A visão humana depende essencialmente da capacidade fisiológica de realizarmos a transdução entre as formas de energia luminosa e elétrica. Para que isto ocorra nossos olhos apresentam estruturas que permitem a captação, direcionamento e absorção de parte do espectro luminoso gerado pelas fontes de luz do ambiente.

Na porção neurosensorial da retina estão localizadas as camadas celulares responsáveis pelo processamento dessa informação eletromagnética que culminará com o disparo de potenciais eletroquímicos em direção as vias corticais superiores (SOLOMON; LENNIE, 2007). Dentre estas células encontram-se os cones e bastonetes, neurônios diferenciados e especializados, excitáveis na faixa espectral de 400 a 780 nm (PALCZEWSKI, 2012) nos quais é iniciada a cascata de fototransdução conhecida como ciclo visual.

As retinopatias hereditárias, também conhecidas como Distrofias Retinianas Hereditárias (DRH), são definidas como o conjunto de alterações genéticas nas quais ocorrem perdas progressivas na função dos fotorreceptores e/ou das células do epitélio pigmentado da retina (EPR). Estas alterações evoluem de maneira gradual ocasionando um prejuízo precoce da visão nos pacientes. (STROM; GORIM, 2013). As perdas visuais ocasionadas por distrofias maculares estão entre as principais causas de cegueira irreversível no mundo desenvolvido (VASIREDDY et al., 2010).

As distrofias maculares de origem hereditária são reconhecidas como um grupo de doenças causadas por uma mutação em um gene específico sendo, portanto, também referidas como patologias monogênicas. Estas distrofias são divididas em subtipos de acordo com os sinais clínicos apresentados pelos indivíduos. (MOLDAY; ZANG, 2010).

## 1.2 A MACULOPATIA DE STARGARDT

### 1.2.1 Definição e Aspectos Clínicos para o Diagnóstico

A maculopatia de Stargardt (CID10, H35.5) ou distrofia macular hereditária de Stargardt é classificada como uma maculopatia degenerativa juvenil ou de início precoce por ser tipicamente apresentada por indivíduos com idades variando entre cinco a vinte anos (ARMSTRONG et al., 1998; SCHOLL et al., 2001; FU et al., 2006). Define-se como maculopatia degenerativa a manifestação patológica com perda da visão central havendo a preservação variável da visão periférica em indivíduos de qualquer faixa etária (RATTNER; NATHANS, 2006; HAINES et al., 2007).

O primeiro relato clínico da maculopatia de Stargardt foi descrito em 1909 pelo oftalmologista alemão Karl Bruno Stargardt. Ele descreveu em duas famílias não relacionadas (sete sujeitos), a ocorrência de alterações visuais progressivas, bilaterais e simétricas na região foveal ocasionando perda parcial ou total da visão central. Todos os sete sujeitos afetados pertenciam a uma única geração não havendo diferença entre homens e mulheres, o que de imediato sugeriu uma doença de herança autossômica recessiva (KRILL; DEUTMAN, 1972; AABERG, 1986).

Além das características acima, Stargardt documentou com precisão a progressão entre os estágios iniciais com pequena redução de acuidade visual, até o surgimento de uma área atrófica no epitélio pigmentado retiniano de orientação horizontal, forma ovalada, e coloração bronze-pálida. Na maioria dos olhos notava-se também a presença de pequenas manchas pontuais amarelo-esbranquiçadas, de aspecto flocular, ao redor da área atrófica. Os pacientes não se queixavam de perdas da visão periférica e nem de dificuldades para a visão em ambientes escotópicos (AABERG, 1986).

O diagnóstico da doença de Stargardt é basicamente realizado através de exames de imagem do fundo do olho do paciente, que geralmente procura um serviço

oftalmológico se queixando pela presença de uma mancha com borramento escuro na região central do seu campo visual. À fundoscopia clássica são detectadas lesões maculares que se assemelham morfológicamente a uma placa de bronze batida (Figura 1), além de manchas de formas e aspectos correspondentes ao acúmulo excessivo de lipofuscina no pólo apical das células do epitélio pigmentado da retina (MAIA et al., 2008). Esta deposição de lipofuscina produz um escurecimento da coroide (silêncio coroideo) gerando uma hipofluorescência como consequência do bloqueio do córiocapilar (KAPPADIA, 2000). A angiofluoresceínografia é o exame recorrente para o diagnóstico de Stargardt por evidenciar a coroide escura, hipofluorescente, na qual a vasculatura retiniana e em especial os capilares aparecem claramente destacados (DEUTMAN, 2003).

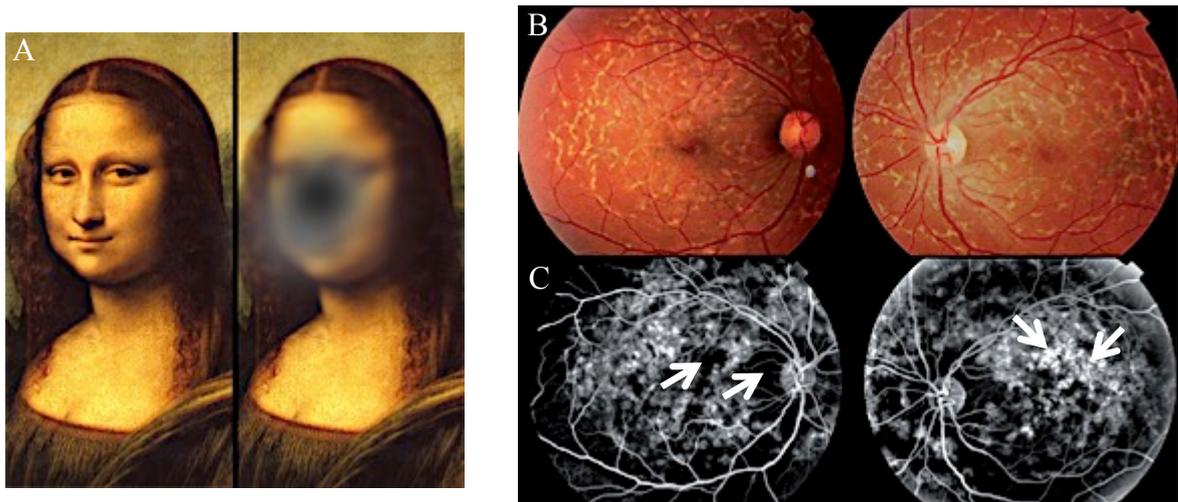


Figura 1 – Aspectos característicos da maculopatia de Stargardt. A. Padrão de visão sugerido para o paciente portador da maculopatia de Stargardt com o borramento na região central do campo visual; B. Retinografia mostrando as lesões retinianas com a aparência de uma placa de bronze batido; C. Angiofluoresceínografia evidenciando as áreas da retina hipo (regiões escuras) e hiperfluorescentes (regiões claras) ocasionadas pela deposição disforme de lipofuscina nas células do epitélio pigmentado. (Retirado de MAIA et al., 2008).

As alterações maculares ocorrem primariamente podendo ou não ser acompanhadas de comprometimento periférico, produzindo um quadro oftalmoscópico semelhante ao detectado em *fundus flavimaculatus* (WELEBER, 1994; HAMEL, 2007).

A diminuição da acuidade visual é precedente ao aparecimento das lesões e manchas, e quanto mais precoce (na primeira década de vida) forem os sintomas, mais severa e acelerada é a evolução do quadro clínico. Na grande maioria dos casos mais avançados, onde não há perda completa da visão, ocorre estabilização da acuidade visual em aproximadamente 20/200 a 20/400 (ZHANG et al., 1995; MAIA et al., 2008).

Entre as décadas de 1970 e 1980 houve publicações descrevendo a classificação da doença de Stargardt em categorias ou estágios segundo o grau de comprometimento apresentado pelos pacientes. Em geral todas elas se assemelham quanto às alterações na morfologia observada ao exame de fundo de olho. As publicações mais recentes contendo classificações também utilizaram dados de registro eletrofisiológico de campo total e respostas a testes psicofísicos de sensibilidade ao contraste de estímulos cromáticos (KAPADIA, 2000; WALIA; FISHMAN, 2009; BURKE; TSANG, 2011). As características clínicas identificadas por exames fundoscópicos estão resumidas na Tabela 1 e ilustradas a seguir na Figura 2.

Autores	Estágio I	II	Estágio III	Estágio IV
Fishman (1976)	Presença de manchas floculares na fóvea e eventual atrofia do epitélio pigmentado	Manchas floculares bem mais numerosas e atrofia macular	Presença de manchas difusas e reabsorvidas com atrofia do córiocapilar	Manchas floculares reabsorvidas difusas e extensa atrofia do córiocapilar e epitélio pigmentado
Noble e Carr (1979)	Degeneração macular com ou sem manchas floculares perifoveais	Difusão de manchas floculares para fora da região macular	Extensão da atrofia para a periferia da retina	Aglutinação de pigmentação e atenuação vascular
Aaberg (1986)	Degeneração macular sem manchas floculares	Degeneração macular com manchas floculares	Degeneração macular com difusão de manchas floculares	Difusão de manchas procedendo à degeneração macular
Gass (1987)	<i>Vermillion fundi</i> e ausência de fluorescência coroidal	Atrofia macular com ou sem manchas floculares	Atrofia macular com sinais e sintomas de retinose pigmentar	Presença de manchas sem associação a atrofia macular

Tabela 1 – Classificação em estágios de acordo com a evolução clínica da maculopatia de Stargardt (retirado de KAPADIA, 2000; KIM; FISHMAN, 2006).

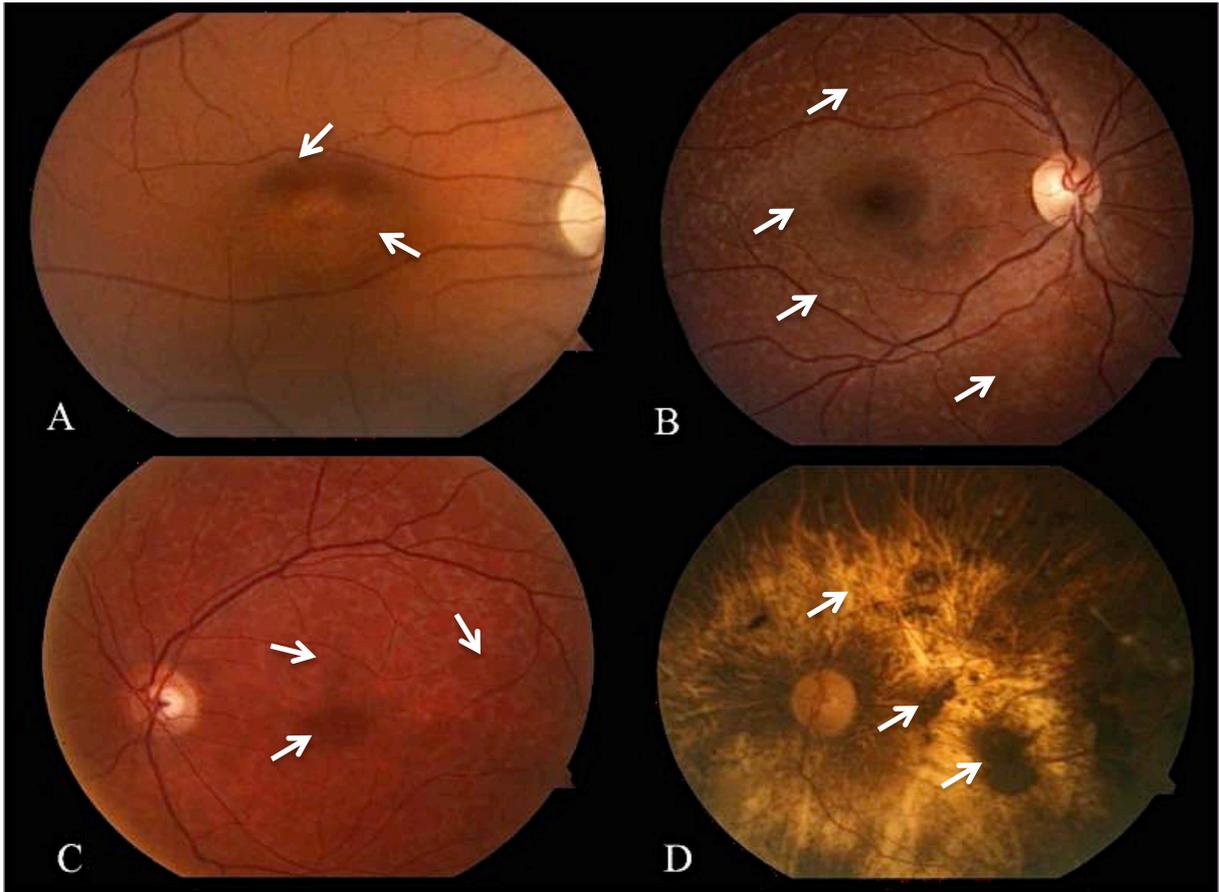


Figura 2 – Imagens retinográficas representativas dos quatro estágios de evolução clínica em diferentes sujeitos portadores da maculopatia de Stargardt. Estágio I: em A observa-se alterações na fóvea com ausência de manchas floculares; Estágio II: em B há a presença de manchas floculares distribuídas ao redor da fóvea e além dos arcos vasculares; Estágio III: em C nota-se a reabsorção das manchas floculares e o desenvolvimento de atrofia córioretinal; Estágio IV: em D é notória a maior extensão do dano córioretinal bem como a atrofia do epitélio pigmentado em praticamente toda a retina (BURKE & TSANG, 2011).

Atualmente há pelo menos cerca de 25 tipos diferentes de maculopatias hereditárias distróficas identificadas (ZHANG et al., 1995). Em alguns casos, para a melhor definição do diagnóstico são realizados testes complementares como a tomografia de coerência óptica retiniana (TCOR) e o eletrorretinograma multifocal (ERGmf). Estes testes têm demonstrado grande eficiência na detecção de alterações das camadas e estruturas retinianas através do imageamento de alta resolução de suas secções transversais além de evidenciarem a disfunção elétrica foveal nos estágios iniciais da doença de Stargardt (KRETSCHMANN et al., 1998; MAIA et al., 2008; GOMES et al., 2009).

A distrofia denominada *fundus flavimaculatus*, proposta por Adolphe Franceschetti em 1962, ilustra a necessidade de testes auxiliares, além daqueles que fazem parte da rotina oftalmológica, para o diagnóstico adequado de uma retinopatia. Desde a sua descrição, também caracterizada pela presença de manchas floculares distribuídas do pólo posterior até a região equatorial da retina, muito se discutiu sobre a sua etiologia que hoje, após a utilização de técnicas moleculares, é reconhecidamente designada como uma forma variante da distrofia de Stargardt (BISWAS-FISS et al., 2012). Até então os testes auxiliares acima descritos não eram capazes de estabelecer a definição consensual para o debate sobre a ocorrência de uma única patologia com acentuada variabilidade clínica ou, duas enfermidades distintas. O marco nesta definição ocorreu nos anos de 1990 a partir do mapeamento genético do locus 1p22.1 do genoma humano e posterior identificação de diversas formas alélicas variáveis segregando-se nas famílias investigadas (ALLIKMETS et al., 1997; SHROYER et al., 1999; DUNO et al., 2012).

### **1.2.2 Respostas Eletroretinográficas na Maculopatia de Stargardt**

A eletrofisiologia humana não invasiva pode ser usada para estudar as disfunções visuais humanas degenerativas, tóxicas e infecciosas. A eletroretinografia de campo total, eletroretinografia de padrões e eletroretinografia multifocal revelam a função retiniana sob diversos ângulos e são muito úteis quando combinadas com os métodos de imagem. Essas técnicas têm sido usadas para estudar as disfunções visuais associadas à degeneração macular associada à idade (FROTA DE ALMEIDA et al., 2014), intoxicação mercurial (VENTURA et al., 2004; COSTA et al., 2008; DA COSTA et al., 2008), intoxicação medicamentosa pela cloroquina (RASTER et al., 2011; DE CARVALHO et al., 2013), toxoplasmose (DE CARVALHO et al., 2009) e dengue hemorrágica (MENDES et al., 2009).

Como a degeneração de Stargardt está confinada e o registro da atividade elétrica da retina provocada pelo estímulo (eletrorretinograma) é uma importante ferramenta para avaliar as implicações celulares funcionais causada pela doença. Os achados eletrorretinográficos em pacientes com degeneração de Stargardt podem ser relativamente variados entre os vários estudos da literatura.

Lachapelle et al. (1989), registrou o eletrorretinograma escotópico e fotópico de 15 pacientes com degeneração de Stargardt e observou que as respostas estavam cerca de 40% menores que sujeitos normais. Fujinami et al. (2011), comparou o eletrorretinograma de cones e para o *flicker* de 30 Hz de pacientes com degeneração de Stargardt registrados em um intervalo médio de 10,5 anos. Eles observaram que 13 de 59 pacientes tiveram pioras do eletrorretinograma. Eles também que todos os pacientes que tinham prévio comprometimento da função de bastonetes mostraram piora eletrofisiológica e que apenas 20% dos pacientes que tiveram respostas eletrofisiológicas normais no primeiro exame tiveram piora no segundo exame. Resultados similares foram encontrados em estudos posteriores do mesmo grupo de pesquisadores (FUJINAMI et al., 2013).

Stavrou et al. (1998), registrou o eletrorretinograma de padrão, o eletrorretinograma para o *flicker* de 30 Hz, o eletrorretinograma de cones e o eletrorretinograma de bastonetes, além do electroculograma em 46 pacientes com degeneração de Stargardt. O eletrorretinograma de padrões foi diminuído em mais de 90% dos pacientes, enquanto o eletrorretinograma para o *flicker* de 30 Hz estava diminuído em cerca de 50%, o eletrorretinograma de bastonetes estava alterado em 30% dos casos e as respostas para cones foram diminuídas em 20% dos casos.

Lois et al. (2001), investigou o perfil eletrofisiológico retiniano de 63 pacientes com degeneração de Stargardt. Eles observaram a existência de 3 grupos de resultados. O grupo 1 (43 pacientes) foi constituído por pacientes com alteração do eletrorretinograma de padrão e

normalidade do eletrorretinograma de cones e bastonetes. O grupo 2 (9 pacientes) tinha alteração do eletrorretinograma de padrão e uma perda função fotópica. O grupo 3 (10 pacientes) havia perda das três modalidades de eletrorretinograma investigadas.

O eletrorretinograma multifocal de pacientes com degeneração de Stargardt tem sido descrito com alterações maculares severas e com o aumento da excentricidade retiniana há uma tendência das respostas normalizarem (KRETSCHMANN et al., 1998; MAIA-LOPES et al., 2008).

### **1.2.3 Tomografia de Coerência Óptica Retiniana na Maculopatia de Stargardt**

As alterações estruturais nas células fotorreceptoras e do epitélio pigmentado da retina (EPR) podem ser observadas através da tomografia de coerência óptica (OCT) de maneira rápida, não invasiva e, com elevada sensibilidade (ZAWADZKI et al., 2009).

Em geral este exame é utilizado para confirmação diagnóstica e/ou para acompanhamento da evolução das perdas visuais dos sujeitos afetados. Há estudos que demonstram associações entre as lesões floculares retinianas com a perda da sensibilidade visual e alterações na camada de fotorreceptores (GOMES et al., 2009; QUERQUER et al., 2009; mVERDINA et al., 2014). Os achados patológicos do OCT em sujeitos com a retinopatia de Stargardt incluem diminuição da espessura foveolar, perda de fotorreceptores e alterações na camada nuclear externa, além das anormalidades no EPR (ERGUN et al., 2005).

Querques et al. (2009), descreveu alterações na morfologia da camada de fotorreceptores e no EPR e, concluiu que a presença de depósitos hiper-reflexivos de lipofuscina são úteis como marcadores da evolução da atrofia foveolar. Estudos realizados por Volmer et al. (2011) e Testa et al. (2013) demonstraram a existência de correlação positiva entre a acuidade visual e a preservação da junção dos segmentos internos e externos dos fotorreceptores.

As análises através do OCT demonstram que as medidas quantitativas de alteração da espessura macular além de úteis para o diagnóstico, também proporcionam avaliações comparativas para o monitoramento da progressão das perdas visuais (VOLMER et al., 2011).

#### **1.2.4 Epidemiologia da Maculopatia de Stargardt**

As diversas formas de DRH atualmente reconhecidas estão associadas a 202 genes já caracterizados em um total de 242 loci identificados no genoma humano (<https://sph.uth.edu/retnet/disease.htm>). Por ser um grupo tão diverso de patologias não existem dados detalhados sobre os indicadores epidemiológicos para a maioria dos casos. A exceção são os estudos para as patologias mais frequentes como a degeneração macular senil e retinose pigmentar (CONGDON et al., 2004; MELLOUGH et al., 2009).

A maculopatia de Stargardt é a DRH de maior frequência dentre aquelas que acometem a região da mácula sendo encontrada em 7% de todos os indivíduos que apresentam uma distrofia retiniana (KAPLAN et al., 1993; MUSARELLA, 2001). Além disso, é a forma mais comum de distrofia macular infanto-juvenil (ROTENSTREICH et al., 2003; CHACÓN-CAMACHO et al., 2013). Ela também é a distrofia macular de herança recessiva mais frequente no mundo. As estimativas disponíveis apontam para uma taxa de prevalência entre 1 em 8.000 a 1 em 10.000 indivíduos, não havendo valores para a sua incidência (DEUTMAN, 2003). E por se tratar de uma herança autossômica não há diferenças entre os sexos, assim homens e mulheres são igualmente afetados.

Os estudos realizados nos últimos anos dos quais podemos extrair informações epidemiológicas apresentam dados gerais sobre a prevalência e progressão de retinopatias hereditárias nas populações amostradas. Dentre eles destaca-se o estudo publicado por Puech et al. (1991) apresentando dados sobre a prevalência de DRH em cerca de 4 milhões de

franceses avaliados por um período de 18 anos. A prevalência calculada para as maculopatias hereditárias juvenis foi de 1:3975 com 46% dos casos associados a doença de Stargardt. Ao considerar-se somente a doença de Stargardt foram detectados 286 casos num total de 1660 distrofias identificadas, totalizando uma prevalência estimada em 1:8627 indivíduos.

Na tentativa de determinar o prognóstico dos sujeitos afetados através de medidas periódicas da acuidade visual, Itabashi et al. (1993), Rotenstreich et al. (2003), Oh et al. (2004) e Kim e Fishman (2006) realizaram estudos em consórcios amostrais restritos à portadores da doença de Stargardt. Os resultados obtidos apesar de apresentarem algumas discordâncias por diferenças metodológicas, corroboram quanto ao fato de que a função visual dos indivíduos varia em direção a deterioração dependendo do estágio de classificação, tipos e localização das lesões, e idade de início da doença de Stargardt.

No Brasil os dados publicados em 2012 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), com base no censo 2010<sup>2</sup>, informam que quase 1/4 da população (23,9%) declarou possuir algum tipo de deficiência física, o que significa cerca de 45,6 milhões de pessoas. Deste total 18,8% correspondem a deficiências na visão. São quase 35,8 milhões de pessoas com algum tipo de dificuldade para enxergar. O mesmo censo 2010 determinou que há 66.312.895 brasileiros na faixa etária de até 20 anos de idade. Se utilizarmos a prevalência estimada (1:8000 a 10.000) para a maculopatia de Stargardt teríamos um total variando entre 8,2 a 6,6 mil jovens afetados por esta retinopatia hereditária.

### 1.3 BIOLOGIA MOLECULAR DA MACULOPATIA DE STARGARDT

As descrições feitas por K. B. Stargardt sobre a maculopatia juvenil com prevalência familiar que posteriormente passou a ter seu nome, além de úteis na sua caracterização, também possibilitaram o desenvolvimento de metodologias para a

---

<sup>2</sup> Neste censo foram selecionados 6.192.332 domicílios, totalizando 20.635.472 sujeitos, em 5565 municípios brasileiros, o que representou uma fração amostral efetiva da ordem de 10,7% dos brasileiros distribuídos nas cinco regiões geográficas do país.

identificação do seu componente genético causal (STARGARDT, 1909; 1913; 1916 apud IRVINE; WEGERLAND JR, 1972). Durante os anos subsequentes a essas publicações surgiram estudos descrevendo a ocorrência da maculopatia de Stargardt sobretudo nos Estados Unidos (IRVINE; WERGELAND, 1972; NOBLE; CARR, 1979; AABERG, 1986; ITABASHI et al., 1993) e na Europa (GELISKEN, DE LAEY; 1985; HOYNG et al., 1996).

As tentativas de identificação do gene causador desta maculopatia foram iniciadas com o mapeamento da região cromossômica segregante entre os indivíduos afetados nas famílias investigadas. Utilizando a genotipagem de marcadores microssatélites para análises de ligação entre cromossomos, Kaplan et al. (1993) identificaram a região 1p21-p13 localizada num intervalo de 6,4 cM (centiMorgans) entre os marcadores D1S424 e D1S236, como a região que conteria o gene responsável pela forma autossômica recessiva da maculopatia de Stargardt.

A seguir, em um dos mais amplos estudos envolvendo 47 famílias com um total de 107 indivíduos diagnosticados com a maculopatia de Stargardt, Anderson et al. (1995) descreveram o mapa físico e o conjunto de clones contínuos (*contigs*) que formava o cromossomo artificial de levedura (YAC – *yeast artificial chromossome*) contendo as regiões flangeadoras e o locus para a maculopatia de Stargardt. Os dados publicados corroboravam o cromossomo 1 como o portador do locus em questão, no intervalo de 4cM entre os marcadores D1S435 e D1S236.

Em estudos posteriores publicados simultaneamente em 1996, Weber et al., e Hoyng et al., relataram com pequena variação as mesmas regiões cromossômicas 1p21-p13 e 1p22-p21 e conseqüentemente refinaram essas regiões flangeadoras do provável gene para os intervalos de 3cM entre os marcadores D1S4242 e D1S497, e para 2 cM entre os marcadores D1S406 e D1S236.

É importante ressaltar que todas as abordagens até aqui descritas objetivavam a identificação de um gene causador para a forma autossômica recessiva da maculopatia de Stargardt. Pois, no mesmo período há publicações contendo estudos de mapeamento genético

para formas fenotipicamente semelhantes com herança autossômica dominante envolvendo as regiões cromossômicas 6q11-q15 (STONE et al., 1994) e 13q34 (ZHANG et al., 1994).

### **1.3.1 O Gene Causador da Forma Autossômica Recessiva da Maculopatia de Stargardt**

Allikmets et al. (1997a); através da clonagem e do sequenciamento automatizado de regiões do DNA de famílias norte-americanas e da Arábia Saudita, identificaram o gene causador da forma autossômica recessiva da maculopatia de Stargardt. O método utilizado consistiu na busca por homologias entre sequências nucleotídicas expressas em bancos de clones de milhares de cDNAs obtidos a partir de retinas humanas.

O gene identificado é parte de uma grande família multigênica cujos transcritos determinam a síntese de proteínas integrais de membrana com função de movimentação unidirecional de diversos substratos à custa da hidrólise de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) (HIGGINS, 1992). Denominado originalmente de ABCR (ATP Binding Cassette Retina-specific) por ter sido detectado através de hibridização do seu RNA mensageiro no tecido retiniano humano, as primeiras análises conduzidas para a identificação de variantes alélicas resultaram na identificação de 19 diferentes mutações, das quais a maioria (13) representavam alterações nucleotídicas pontuais ocasionando mudança no aminoácido codificado (ALLIKMETS et al., 1997a).

Ainda no mesmo ano, dois trabalhos independentes identificaram simultaneamente o gene associado a maculopatia de Stargardt como um novo membro da superfamília de proteínas cassete ABC (do inglês ATP Binding Cassette), que recebeu a denominação de ABCA4 por ter sido a quarta variante polipeptídica identificada dentro da subfamília A (ILLING et al., 1997; AZARIAN; TRAVIS, 1997).

O gene ABCA4 (NG\_009073.1) encontra-se localizado na região 1p21-p22.1 do primeiro par cromossômico humano e é formado por 135.313 nucleotídeos com 50 éxons

responsáveis pela síntese de uma proteína de 2273 aminoácidos com peso molecular de 256 KDa (KAMINSKI et al., 2006).

Os éxons possuem variação de tamanho de 33 a 406 pb com média de 146 nucleotídeos e seguem o padrão AG/TG na maioria das junções intron-éxon de processamento para a síntese do RNA mensageiro maduro, exceto para aquelas entre os fragmentos éxon-46/intron-46 e éxon-48/intron-48, cujo padrão é AG/GC. A região codificante deste gene forma um polinucleotídeo de 6819 pb, incluindo ainda em seu quadro de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*) um fragmento de 404 pb da região 3' não traduzida. O sinal de poliadenilação, AAUAAA, está localizado no último éxon (50) a 19 pb a montante da cauda poli (A) (AZARIAN et al., 1998; GERBER et al., 1998).

### **1.3.2 A Proteína ABCA4: estrutura e localização**

Proteínas para o transporte de metabólitos entre as membranas e organelas celulares são moléculas essenciais à existência da célula. Nas células eucarióticas as proteínas integrais de membrana são capazes de movimentar um vasto número de substâncias, desde pequenas partículas como íons metálicos, até moléculas com elevado pesos moleculares (polipeptídios) (COLEMAN et al., 2013). As proteínas ABC fazem parte deste grupo de moléculas e são energeticamente dependentes da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) para a translocação de seus substratos (DASSA; BOUIGE, 2001). A depender da direção em que o corre em relação ao citoplasma, os transportadores ABC são categorizados como importadores (influxo) ou exportadores (efluxo) de substâncias (WANG et al., 2009).

Nas células do corpo humano há 49 diferentes tipos de proteínas ABC, cada uma delas codificada por um gene específico do nosso genoma. A este conjunto de formas ativas somam-se ainda 21 formas inativas representadas por pseudogenes, ou seja, sequências nucleotídicas não funcionais do genoma com elevada semelhança a uma ou mais sequências

gênicas parálogas. (PIEHLER et al., 2008).

As isoformas que são expressas estão organizadas em 7 subfamílias identificadas de ABCA a ABCG de acordo com a estrutura gênica, composição de aminoácidos e divergência evolutiva apresentada (VASILIOU et al., 2009). A subfamília ABCA é composta por 12 variantes polipeptídicas em sua grande maioria envolvidas no transporte de lipídios em diversos órgãos e células do corpo humano, entre os quais estão: ácidos graxos, colesterol, fosfolipídios, apolipoproteínas e vitaminas (ORAM, 2002; MOLDAY; ZHANG, 2010).

Estruturalmente as proteínas ABC apresentam um padrão de organização comum aos seus membros. Observa-se um arranjo *in tandem* de duas metades funcionalmente conectadas. Em cada metade há um domínio transmembranar (TMD) com vários segmentos em projeções para ambos os lados intra e extra-citoplasmático, além de um domínio cassete-ligante de nucleotídeo (NBD) (QUAZI et al., 2012) (Figura 3). Nos eucariontes esta organização em quatro domínios pode estar codificada em um único polipeptídeo ou em dois ou mais polipeptídios que se associam para a formação do complexo proteico-funcional (TARLING et al., 2013).

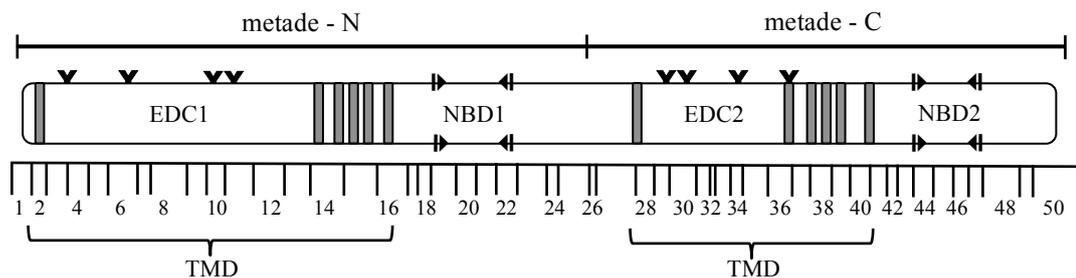


Figura 3 – Organização estrutural linear do transportador ABCA4. As metades N e C possuem seis segmentos (barras verticais cinzas) formadores dos domínios transmembranares (ECD1 e 2) ambos possuindo grandes alças peptídicas glicosiladas (▼) logo após os primeiros segmentos. Estão representados os pontos ligantes (►) de nucleotídeos trifosfatados (NBD1 e 2) fundamentais para a movimentação de derivados retinoicos. A barra horizontal com traços verticais numerados representa os 50 éxons que formam o gene ABCA4 (retirado de AZARIAN et al., 1998).

Nos vertebrados a proteína ABCA4 está localizada nas pilhas de discos membranosos dos fotorreceptores que formam a região denominada de segmento externo destas células. Inicialmente identificada somente nos bastonetes da retina de sapos do gênero *Rana*, a proteína ABCA4 foi posteriormente também detectada nos cones destes animais (PAPERMASTER et al., 1978; PAPERMASTER et al., 1982).

No olho humano são encontrados cerca de cinco milhões de células do tipo cone e 100 milhões do tipo bastonete (SAARI, 2012). De localização retiniana mais central, os cones são divididos nos subtipos S, M e L em resposta a maior sensibilidade luminosa. Os bastonetes são altamente sensíveis à estimulação luminosa e encontram-se densamente dispostos na periferia da retina. Nestas células há cerca de mil discos membranosos formando o seu segmento externo, cada um deles envelopados por membrana lipoprotéica própria que delimita um compartimento interno denominado de espaço intradiscal ou lúmen discal. Nos cones o arranjo dos discos é ligeiramente diferente pela ausência de pilhas de discos lamelares já que há continuidade entre os discos e a membrana citoplasmática que forma o segmento externo (Figura 4). Isto resulta em uma morfologia celular em dobradura dos discos com terminação em forma cônica (MUSTAFI et al., 2009; MOLDAY, ZANG; 2010).

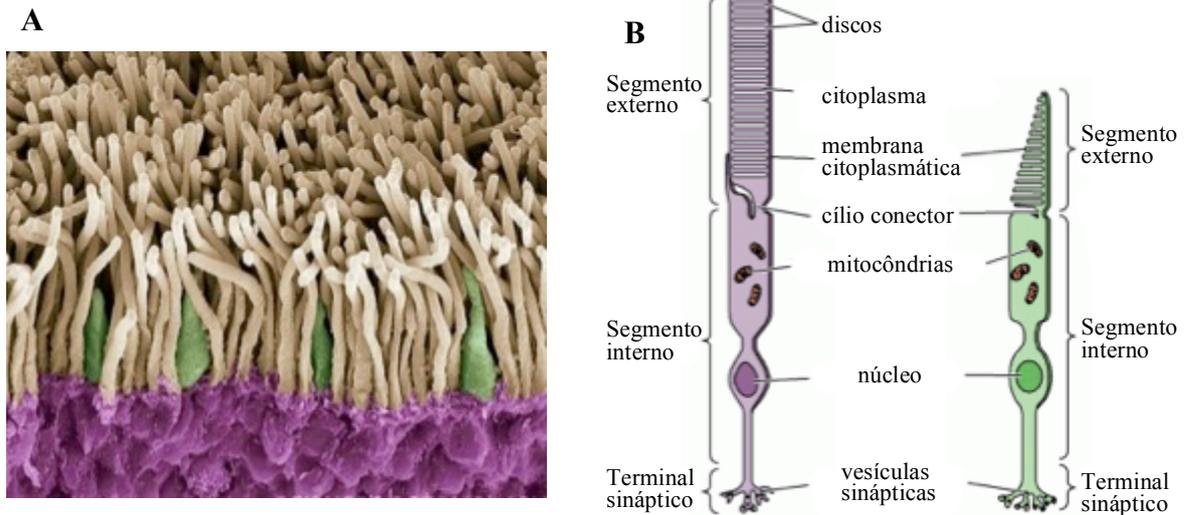


Figura 4 – Fotorreceptores do tipo cone e bastonete. Em A, fotomicrografia colorida artificialmente de secção da retina mostrando cones (verde) e bastonetes (marrom); em B, desenhos esquemáticos representando as segmentações presentes na morfologia dos fotorreceptores humanos. Os segmentos externos são em sua totalidade formados pelos discos membranosos aonde encontramos a proteína ABCA4 (retirado de <https://www.flickr.com/photos/scienceillustrated/4602238247/> e <http://vr-core.wustl.edu/Pages/Chen-Lab-Projects.aspx>).

Cada um desses discos do segmento externo é composto por duas membranas morfologicamente achatadas na porção central e dilatadas nas extremidades formando alças semelhantes à grampos de cabelos. Destas alças uma ou mais incisuras penetram em direção ao centro do disco (MOLDAY, ZANG; 2010) (Figura 5). Imersa nas membranas que delimitam os discos e de localização restrita as suas alças e incisuras, a proteína ABCA4 apresenta em ambas as metades de seu arranjo molecular um segmento transmembranar inicial seguido de um extenso domínio exocitoplasmático (ECD) que se projeta para a região externa ao lúmen. As metades N e C-terminal ainda apresentam mais outros cinco segmentos transmembranares (TMD) e um domínio ligante de nucleotídeos (NBD) localizados após o ECD (BUNGERT et al., 2001).

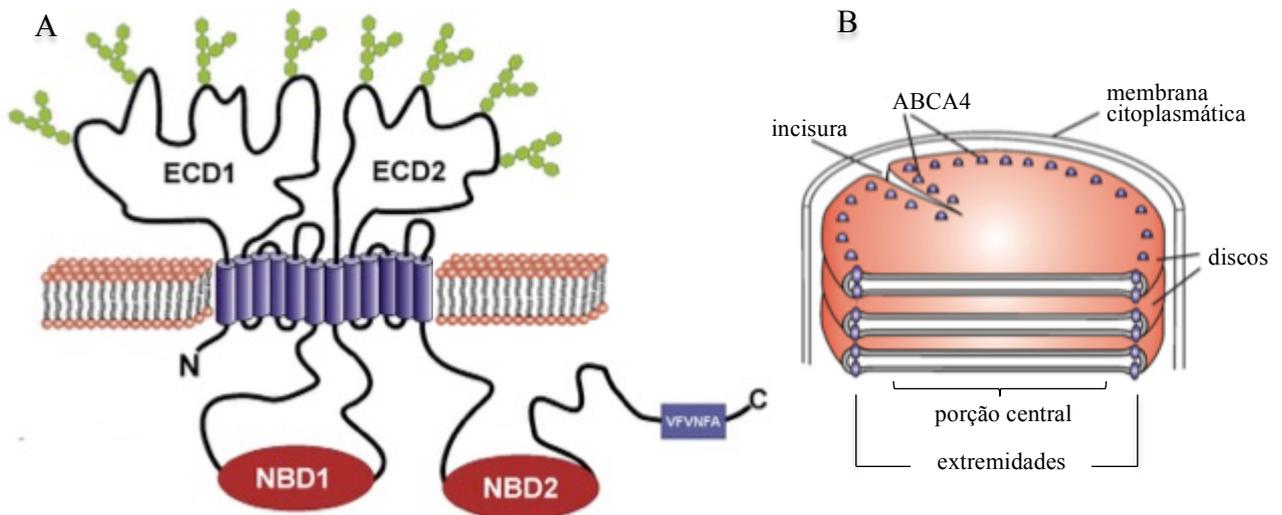


Figura 5 – Estrutura e localização da proteína ABCA4. Em A temos a representação do polipeptídeo ABCA4 com as duas alças glicosiladas (hexágonos verdes) que formam os domínios exocitoplasmáticos (ECD1 e 2); inseridos na membrana dos discos os doze segmentos transmembranares (TMD), e do lado intracitoplasmático dos discos outras duas alças formando os dois domínios ligantes de nucleotídeos fosfatados (NBD1 e 2), além do motivo VFNFA na extremidade C-terminal. Em B está representada uma porção com três discos membranosos do segmento externo de um bastonete com várias proteínas ABCA4 presentes nas extremidades das bordas dilatadas dos discos (retirado de MOLDAY, ZANG; 2010).

A extremidade N-terminal é formada por 24 aminoácidos anteriores ao primeiro segmento TMD e, na outra ponta, 140 aminoácidos formam a porção C-terminal posteriores ao último segmento TMD. Cada uma das doze hélices alfa que formam estes segmentos TMD possuem cerca de 21 aminoácidos com elevada variabilidade e formadores de domínios de ligação e translocação dos substratos lipídicos através da membrana (BUNGERT et al., 2001; MOLDAY; ZHANG, 2010).

Os ECDs 1 e 2 são formados respectivamente por 602 e 289 resíduos peptídicos cada um deles apresentando respectivamente três e quatro pontos de glicosilação nos motivos Asn-X-Ser/Thr destes domínios. A glicosilação é uma modificação pós-traducional que se acredita ser importante na estruturação/estabilidade, movimentação de

substratos e inserção das proteínas transportadoras nas membranas celulares (TSYBOVSKY et al., 2013). Na proteína ABCA4 especula-se que pelo seu tamanho e caráter hidrofílico, as glicosilações são determinantes para a sua localização nas extremidades dos discos do segmento externo dos fotorreceptores (BUNGERT et al., 2001; TSYBOVSKY et al., 2011).

Completando essa descrição estrutural da proteína ABCA4 são encontradas em projeção para o lado interno dos discos lamelares as duas alças peptídicas que formam os domínios ligantes de nucleotídeos (NBD). Identificados por NBD1 e NBD2 e respectivamente com tamanhos de 521 e 375 aminoácidos (BISWAS-FISS et al., 2010). Estas estruturas apresentam assinaturas moleculares, como o resíduo LSSGQ, que servem para a sua identificação entre a vários transportadores ABC. Embora estes domínios apresentem motivos sequenciais idênticos entre si do tipo Walker A e B, reconhecidos respectivamente pelas sequências GxxGxGKS/T e  $\phi\phi\phi\phi$ DE (onde x é qualquer aminoácido, e  $\phi$  (lê-se Fi) é um aminoácido hidrofóbico e as letras correspondem a G-glicina, K-lisina, S-serina, T-treonina, D-ácido aspártico e E-ácido glutâmico), eles são iguais somente em 35% de seus de aminoácidos e, ligam, acoplam e hidrolisam nucleotídeos de maneira diferenciada (AHN et al., 2003; HANSON; WHITEHEART, 2005).

Ainda fazem parte da estrutura destes DLNs as alças A, Q, H e D que possibilitam a formação dos domínios aqui mencionados, além do motivo de sequência VFVNFA, altamente conservado, localizado a 30 aminoácidos do final do terminal-C essencial o enovelamento funcional dessa proteína (AMBUDKAR et al., 2005; ZHONG et al., 2009; MOLDAY; ZHANG, 2010).

### **1.3.3 O Modelo Preditivo da Maculopatia de Stargardt**

Simultaneamente a todas as descobertas referentes ao gene ABCA4 e seu respectivo produto proteico, diversos estudos buscaram a caracterização de um modelo

funcional que justificasse a patologia de Stargardt. Em outras palavras: como alterações na estrutura de uma proteína, ocasionadas por mutações em seu gene codificante, provocariam a morte de fotorreceptores causando uma cegueira irreversível?

A resposta a essa importante constatação está na premissa fundamental de que a manutenção da função visual é totalmente dependente da capacidade de regeneração metabólica do cromóforo retinal 11-cis (PALCEWSKY, 2006; TRAVIS et al., 2007). Este derivado da vitamina A é o cromóforo mais comum encontrado nos fotorreceptores dos vertebrados e, quando ligado às proteínas opsinas dos cones e bastonetes, forma as moléculas captadoras do estímulo luminoso que irá determinar a visão (WANG; KEFALOV, 2011). Diante disto, antes de falar sobre a relação causal do gene ABCA4 com a doença de Stargardt, é importante descrever o metabolismo deste aldeído derivado da vitamina A.

A via metabólica cíclica que regenera o retinal 11-cis é denominada de ciclo visual, ciclo visual retiniano ou ainda ciclo do retinoide (KISER et al., 2012). Este processo ocorre através de uma sequência de reações catalisadas por enzimas associadas às membranas que estão localizadas nos segmentos externos dos fotorreceptores e, principalmente, naquelas que formam o retículo endoplasmático liso presentes nas células do epitélio pigmentado retiniano (EPR) (LAMB; PUGH, 2004). Além destas enzimas, há outras quatro proteínas que agem como chaperonas exibindo elevada afinidade e especificidade aos intermediários retinoicos. Elas garantem o fluxo dos retinoides durante as reações do ciclo de três maneiras: (i) protegendo-os contra degradação, (ii) conduzindo-os às etapas sequenciais de ação catalítica, e (iii) solubilizando-os na fase aquosa dos ambientes celulares (LAMB; PUGH, 2004; SAARI, 2012).

Como os fotorreceptores funcionam em várias condições de luminosidade, conclui-se que há, portanto, diferenças na metabolização dos seus pigmentos visuais. Esta importante observação é apoiada pela constatação de que, embora possuam níveis

comparáveis de saturação de seus fotopigmentos, após a exposição a luz intensa, cones e bastonetes apresentam tempos de recuperação de suas sensibilidades muito diferentes na adaptação ao escuro. Nos cones a adaptação ocorre entre 3 a 4 minutos enquanto para os bastonetes são necessários pelo menos 30 minutos (HECHT et al., 1937). A seguir são descritas as vias cíclicas do retinol nos cones e bastonetes e que fundamentam a compreensão da associação entre o gene ABCA4 e a degeneração macular de Stargardt.

### 1.3.3.1 O CICLO VISUAL NOS BASTONETES

A visão depende da alteração isomérica sofrida pelo cromóforo retinal 11-cis de uma molécula de fotopigmento em consequência da captura de um fóton. Esta fotoisomerização inicia a conversão do fotopigmento que ativa a proteína-G heterotrimérica (transducina) que em seguida dispara os eventos subsequentes da cascata de fototransdução que resultam na sensação visual (PUGH; LAMB, 2000).

O retinol todo-trans (vitamina A) obtido nos alimentos chega aos nossos olhos através da circulação sanguínea coroidal que o transfere para o epitélio pigmentado retiniano para ser convertido a retinal 11-cis e em seguida ser introduzido no fotorreceptor aonde iniciará o ciclo visual (TIMMERS et al., 1999). Então, o cromóforo retinal 11-cis presente nos discos membranosos do segmento externo do bastonete se associa a proteína opsina formando a molécula do pigmento visual denominada rodopsina. Após a absorção de um fóton ocorre a fotoisomerização da forma retinal 11-cis (11cRAL) para retinal todo-trans (atRAL) nos discos membranosos dos bastonetes, a maior parte do retinal todo-trans que foi reduzido a retinol todo-trans (atROL) pela enzima NADPH-dependente retinol todo-trans desidrogenase tipo 8 (todo-trans RDH ou RDH8), segue através da matriz interfotorreceptora com o auxílio da proteína carreadora IRBP (proteína interfotorreceptora ligante de retinoides) em direção a porção apical do epitélio pigmentado retiniano (EPR) (RATTNER et al., 2000).

No EPR este retinol todo-trans é associado a proteína celular ligante de retinol tipo 1 (CRBP) (NOY, 2000) sendo difundido até a porção basal da célula pigmentada onde é

esterificado a retinilil éster todo-trans (atRE) pela enzima lecitina-retinol aciltransferase (LRAT) através da ligação à moléculas de fosfatidilcolina presentes na membrana do EPR (SAARI; BREDBERG, 1989; MOISEYEV et al., 2003).

A seguir, o éster retinil todo-trans sofre simultaneamente reações de hidrólise e isomerização catalisadas pela enzima isomerohidrolase RPE65 (proteína específica do epitélio pigmentado com 65 kDa – IMH1) originando o retinol 11-cis (11cROL) (GOLLAPALLI et al., 2003). Associado a outra proteína transportadora, a CRALBP (proteína celular ligante de retinaldeído), o retinol 11-cis é finalmente oxidado à forma aldeídica retinal 11-cis pela enzima retinal 11-cis desidrogenase tipo 5 (11-cis RDH ou RDH5) (SAARI et al., 2009).

Encerrando o ciclo, a forma retinal 11-cis deixa o EPR na direção a matriz interfotorreceptora em associação a um fator regulatório de antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHERF-1 (fator regulador de troca iônica tipo 1), acoplado a um complexo de transporte composto pela proteína ligante de membrana Ezrin, conectada aos filamentos actínicos dos processos apicais do EPR (SAARI et al., 2009; BRETSCHER, et al., 2002). Este complexo proteico então entrega o retinal 11-cis para a proteína de transporte IRBP de volta ao bastonete através da matriz extracelular interfotorreceptora para posterior regeneração do fotorpigmento (BOK, 1985). Dada a necessidade de manutenção constante deste suprimento de retinal 11-cis, esta mesma aciltransferase LRAT esterifica o 11-cis ROL para formar o 11-cis RE (éster retinil 11-cis) que formará um estoque de retinoides 11-cis no EPR para posterior hidrólise pela hidrolase retinil éster 11-cis (11-cis REH), suprindo assim o cromóforo essencial para a regeneração do pigmento visual (MATA; TSIN, 1998; PALCZEWSKI, 2010).

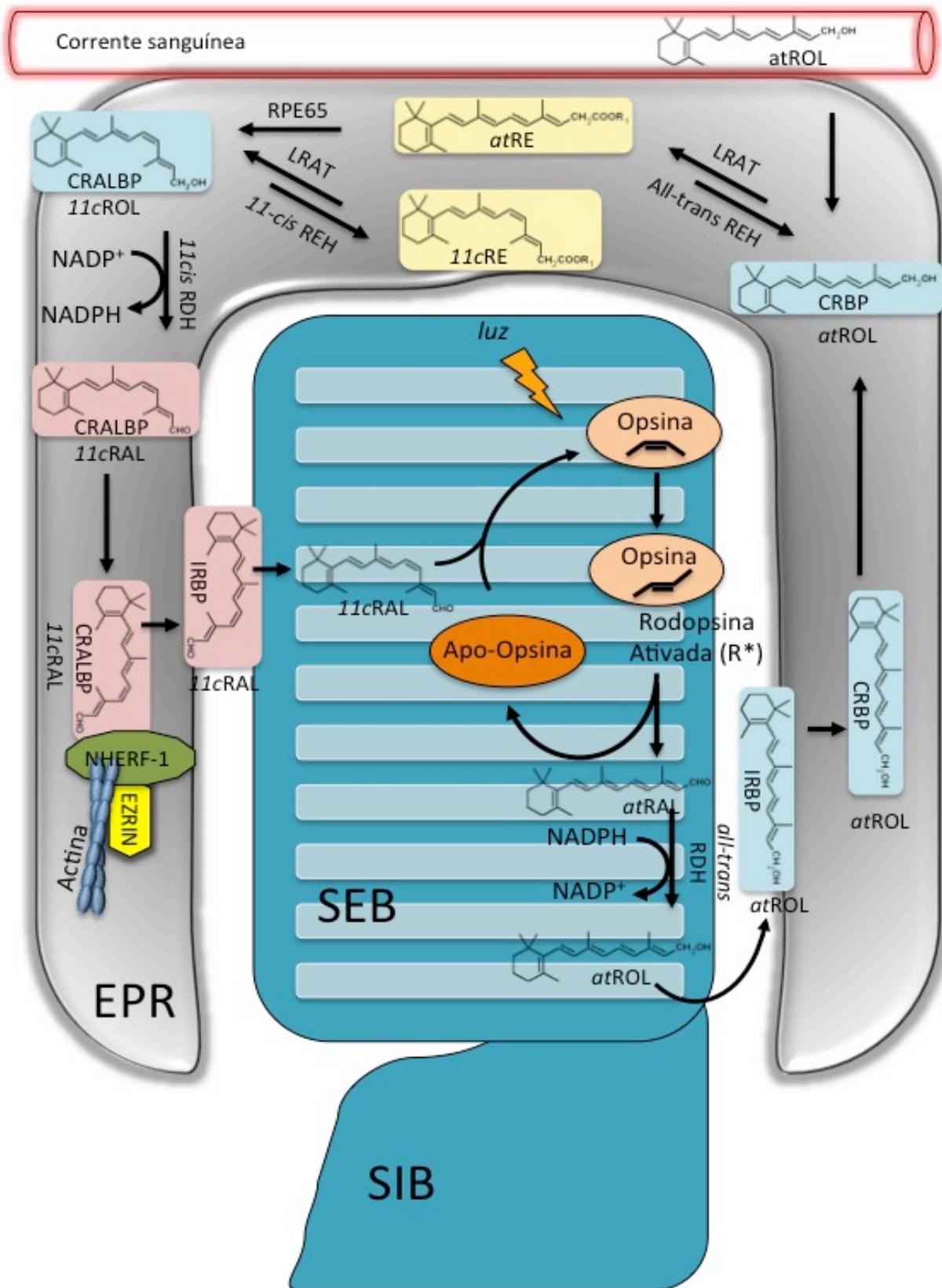


Figura 6 – Esquema proposto para o ciclo visual nos bastonetes. (1) Após isomerização da forma 11cRAL para atRAL ocorre a sua conversão a atROL pela retinol todo-trans desidrogenase, que segue para o EPR via IRBP; (2) Em associação a proteína CRBP1 o atROL é eterificado a atRE pela enzima LRAT; (3) A seguir por ação da REP65 ocorre hidrólise e isomerização do éster renilínico produzindo o 11cROL; (4) Encerrando o ciclo o 11cROL é oxidado a 11cRAL e devolvido ao fotorreceptor via IRBP; (5) Esterificação do 11cROL para estocagem de retinoides no EPR (Adaptado de WANG; KEFALOV, 2011).

### 1.3.3.2 O CICLO VISUAL NOS CONES

O reestabelecimento e a manutenção da sensibilidade visual é dependente do suprimento e adequada regeneração do aldeído vitamínico retinal 11-cis, sobretudo nos cones por apresentarem rápida capacidade de resposta (em condições fotópicas o olho humano detecta estímulos em *flickers* de 100Hz (TYLER; HAMER, 1990)), além de manutenção permanente da resposta e ausência de saturação observada mesmo em elevadas condições de luminosidade (LAMB, 2013).

As evidências bioquímicas e fisiológicas consolidam a existência de uma via acessória auxiliar para a regeneração do cromóforo dos cones que garanta a sustentação da atividade fotoquímica (MATA et al., 2002; WOLF, 2004; MUNIZ et al., 2007; WANG; KEFALOV, 2011; VON LITING, 2012). Nesta via cone-específica uma grande parte do retinol todo-trans gerado após a fotólise do retinal 11-cis e redução pela RDH seria transportado através da matriz interfotorreceptora em direção as células de Muller, via proteína IRBP (PARKER et al., 2009; TANG et al., 2013). Nas células de Muller este retinol todo-trans seria transformado no isômero 11-cis pela isomerohidrolase dihidroceramida dessaturase-1 (DES1). Em seguida e em associação a proteína CRALBP, o retinol todo-trans estaria sujeito a duas possibilidades: 1<sup>a</sup> - interações com grupos fosfolipídicos negativamente carregados provocariam o surgimento da forma holo-CRALBP havendo a liberação do retinol 11-cis na matriz interfotorreceptora, associando-se a IRBP e sendo capturado pelo segmento externo do cone; 2<sup>a</sup> - o retinol todo-trans seria oxidado a retinal 11-cis via RDH10 e transportado pela IRPB para ser prontamente utilizado como cromóforo por uma apo-opsina do cone (KAYLOR et al., 2013).

Para a forma retinol 11-cis liberada pela holo-CRALBP a etapa final envolveria a oxidação à forma 11-cis retinal catalisada por uma desidrogenase de retinoides, NADP<sup>+</sup> dependente, ainda não conhecida. Regenerado, o isômero 11-cis retinal se combinaria a apo-opsina formando um novo cromóforo de opsina fotoativo (KAYLOR et al., 2013; 2014).



### 1.3.3.3 O EFEITO RETINOTÓXICO DOS METABÓLITOS DO CICLO VISUAL E A CONTRIBUIÇÃO DO GENE ABCA4 NA MACULOPATIA DE STARGARDT

A completa reutilização do retinal todo-trans através do ciclo visual é fundamental à nossa visão por dois motivos: primeiro por garantir a constância na fotossensibilização dos cones e bastonetes (MAEDA et al., 2011) e, segundo, por impedir a ação citotóxica inerente a si e aos derivados metabólicos que podem ser formados a partir deste aldeído altamente reativo (MAEDA et al., 2009; SPARROW et al., 2010).

Como derivado imediato do retinal 11-cis, o retinal todo-trans, que é liberado após a fotólise deve ser prontamente reduzido a retinol todo-trans e seguir para o EPR para ser reconvertido a sua forma original (Figuras 3 e 4). Porém, sabe-se que uma parte desse retinal todo-trans combina-se de forma reversível com moléculas de fosfatidiletanolamina (PE), uma das classes de fosfolipídios mais abundantes presentes nas membranas dos fotorreceptores (AHN et al., 2000; TRAVIS et al., 2006). Este fosfolipídio constitui cerca de 37,6% do total de 87% em moles que formam a fração lipídica dos discos membranosos do segmento externo dos fotorreceptores (FLIESLER; ANDERSON, 1983).

Até agora não há estimativa precisa sobre a quantidade de retinal todo-trans que permanece na espaço intradiscal dos fotorreceptores. Esta é uma resposta de grande importância para a fisiopatologia da maculopatia de Stargardt, já que é a partir deste aprisionamento do retinal todo-trans intradiscal que surgirão as formas bisretinoides<sup>3</sup> tóxicas que ocasionam a degeneração dos fotorreceptores.

Os modelos experimentais que utilizam ratos e camundongos sugerem que cerca de 25 a 30% do retinal todo-trans gerado no ciclo visual não se difunde de imediato para o espaço citoplasmático (LAMB; PUGH, 2004; PAWAR et al., 2008). Ao invés de seguir para a reação catalisada pela RDH, o retinal todo-trans prontamente reage com a amina

---

<sup>3</sup> Quando há dois ou mais substituintes ramificados idênticos em uma molécula, usamos prefixos multiplicativos modificados para indicar o número deles. Assim, o termo *bis* representa a ocorrência de duas espécies orgânicas no lugar dos átomos de hidrogênio de uma cadeia hidrocarbonada central ou anel benzênico.

primária de uma molécula de fosfatidiletanolamina (formando uma base de Schiff<sup>4</sup>) originando a imina N-retinilideno-fosfatidiletanolamina (N-ret-PE) nos discos membranosos. Esta reação, embora reversível, atrasa e pode até impedir a formação do retinol todo-trans que iniciará o ciclo visual (Figura 8).

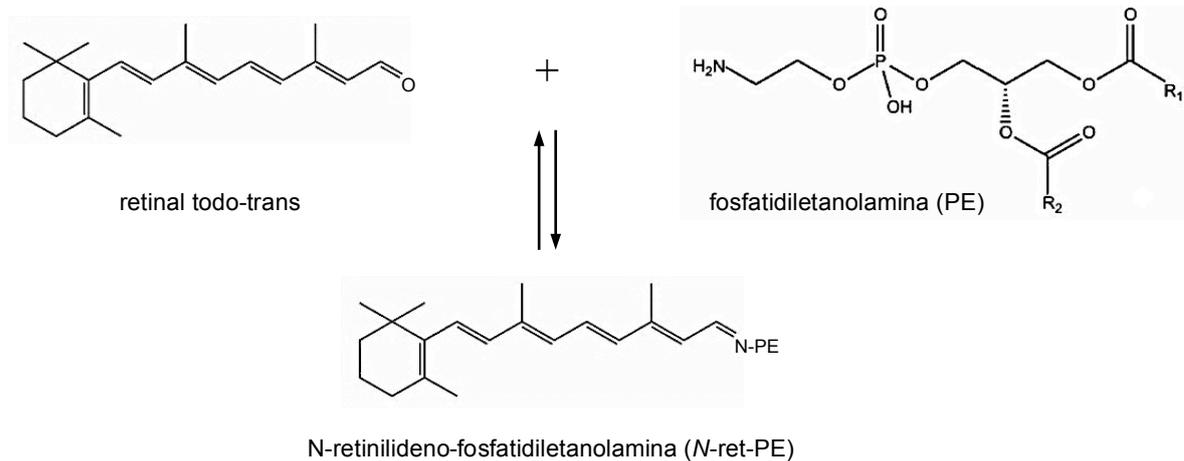


Figura 8 – Formação do N-ret-PE. Reação reversível presente nos discos membranosos do segmento externo dos fotorreceptores (retirado de MOLDAY; ZANG, 2010).

É neste momento que a proteína ABCA4 entra em ação garantindo a manutenção do fluxo do retinal todo-trans para o citoplasma do segmento externo dos fotorreceptores. Portanto, a proteína ABCA4 funciona como um transportador de retinoides que utiliza energia da hidrólise de ATP impedindo o acúmulo do retinal todo-trans nos discos membranosos dos fotorreceptores (MOLDAY et al., 2009; SULLIVAN, 2009; MOLDAY; ZHANG, 2010).

Os modelos propostos para o mecanismo de funcionamento do ABCA4 corroboram a ideia de que este transportador desloque o N-ret-PE através das membranas dos discos dos fotorreceptores, permitindo assim que o retinal todo-trans seja reduzido a retinol todo-trans pela retinol desidrogenase (RDH8) dissociando o n-ret-PE em retinal e PE (SUN et al., 1999; MOLDAY; ZHANG, 2010; QUAZI et al., 2012; TSYBOVSKY et al., 2013). Na

<sup>4</sup> Uma base de Schiff é o produto da condensação de aminas primárias com compostos carbonílicos. A denominação é em homenagem ao químico alemão Hugo Schiff, quem as descobriu.

primeira etapa deste processo o N-ret-PE se ligaria com elevada afinidade aos domínios transmembranares do ABCA4. Esta ligação seria facilitada pela sua conformação estrutural em estado não ativado no lúmen do disco do fotorreceptor. Nesta condição de repouso os dois domínios exocitoplasmáticos (ECD 1 e 2) encontrariam-se em grande proximidade. Em seguida, a ativação do domínio ligante de nucleotídeo 2 (NBD2) pela entrada de uma molécula de ATP causaria mudanças conformacionais ocasionando um afastamento entre os domínios ECD 1 e 2. Esta repulsão se propagaria até a região transmembranar provocando um movimento de rotação do substrato em direção ao lado citoplasmático dos segmento externo do fotorreceptor. Então, a liberação do retinal todo-trans e da fosfatidiletanolamina ocorreria após a hidrólise da molécula de ATP, o que restabeleceria o estado de repouso do transportador (Figuras 9 e 10).

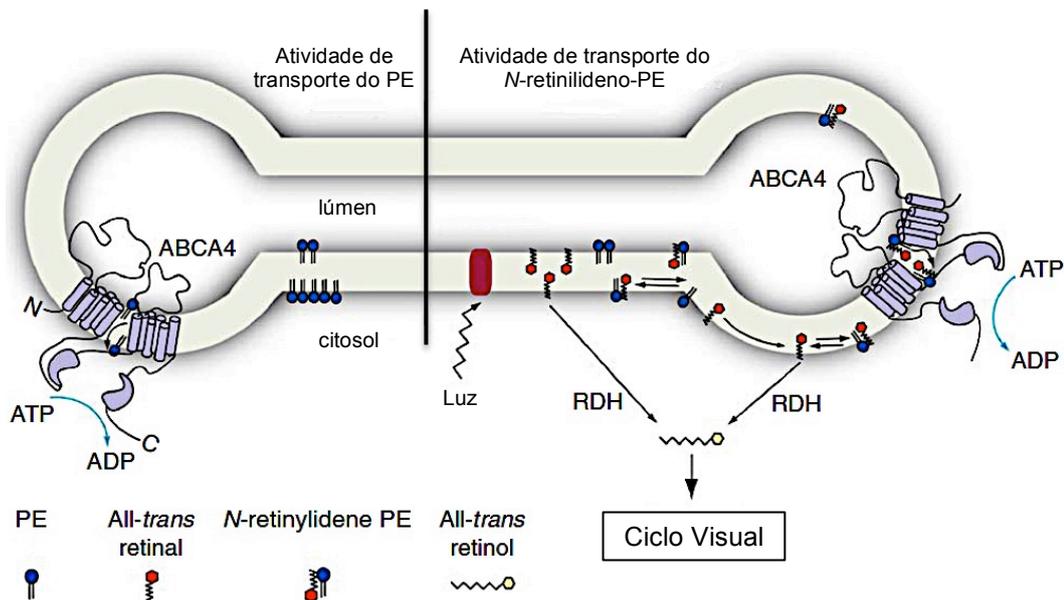


Figura 9 – Desenho esquemático do modelo de funcionamento para o transportador ABCA4. A esquerda, a atividade basal de transporte de fosfatidiletanolamina (PE) pelo ABCA4 do lúmen para o espaço intracitoplasmático dos discos. A direita, a ação do ABCA4 na reversão do N-ret-PE em retinal todo-trans (atRAL) e PE. Esta reação ocorreria a partir do lúmen em direção ao lado citoplasmático dos discos após a fotoisomerização da holo-opsina. A seguir, o atRAL sofre redução a retinol todo-trans pela retinol desidrogenase (RDH8) iniciando normalmente o ciclo visual para a sua regeneração a forma aldeídica retinal 11-cis (retirado de QUAZI et al., 2012).

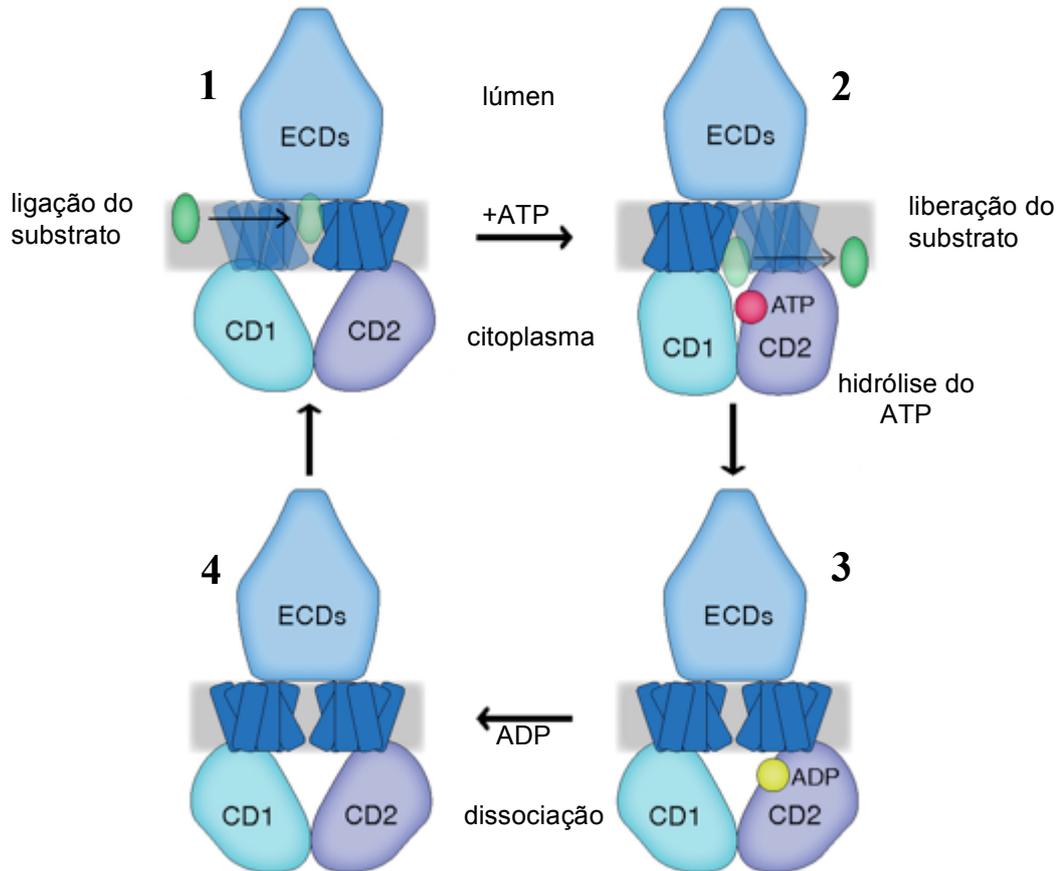


Figura 10 – Desenho esquemático hipotético com a sequência de eventos para o transporte do *N*-retinilideno-PE (*N*-ret-PE) no citoplasma intradiscal dos fotorreceptores. Em sentido horário: (1) o *N*-ret-PE aparece como esfera oval verde associado aos domínios transmembrana (TMD) em azul escuro na porção central; (2) ativação do ABCA4 pela entrada do ATP (esfera vermelha) no domínio ligante de nucleotídeos (CD1) e alteração conformacional se estendendo aos TMD, ocasionando a liberação do substrato; (3) ADP como esfera amarela originário da hidrólise do ATP; (4) o ABCA4 retorna ao estado inicial (retirado de Tsybovsky et al., 2013).

Mas o que ocorre se a proteína ABCA4 não funcionar e houver acúmulo do *N*-ret-PE no segmento externo dos fotorreceptores? Caso haja perda de função ou redução de atividade transportadora do ABCA4, o *N*-ret-PE formado reagirá com uma segunda molécula de retinal todo-trans ocasionando a formação do bisretinoide fosfatidil-dihidropiridina (A2PE). Esta segunda reação de condensação marca o início de uma via sintética que ocasiona a formação espontânea de várias formas di-retinal tóxicas fluorescentes.

Há atualmente cerca de 25 diferentes pigmentos bisretinoides identificados através de técnicas cromatográficas e de espectrometria de massas. Estruturalmente eles

podem ser agrupados dentro de quatro famílias: N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E), A2-glicerofosfoetanolamina (A2-GPE), A2-dihidropiridina-fosfatidiletanolamina (A2-DHP-PE) e dímeros de retinal todo-trans (dímero-fosfatidiletanolamina de retinal todo-trans e dímero-etanolamina de retinal todo-trans) (BOYER et al., 2012b; SPARROW et al., 2012).

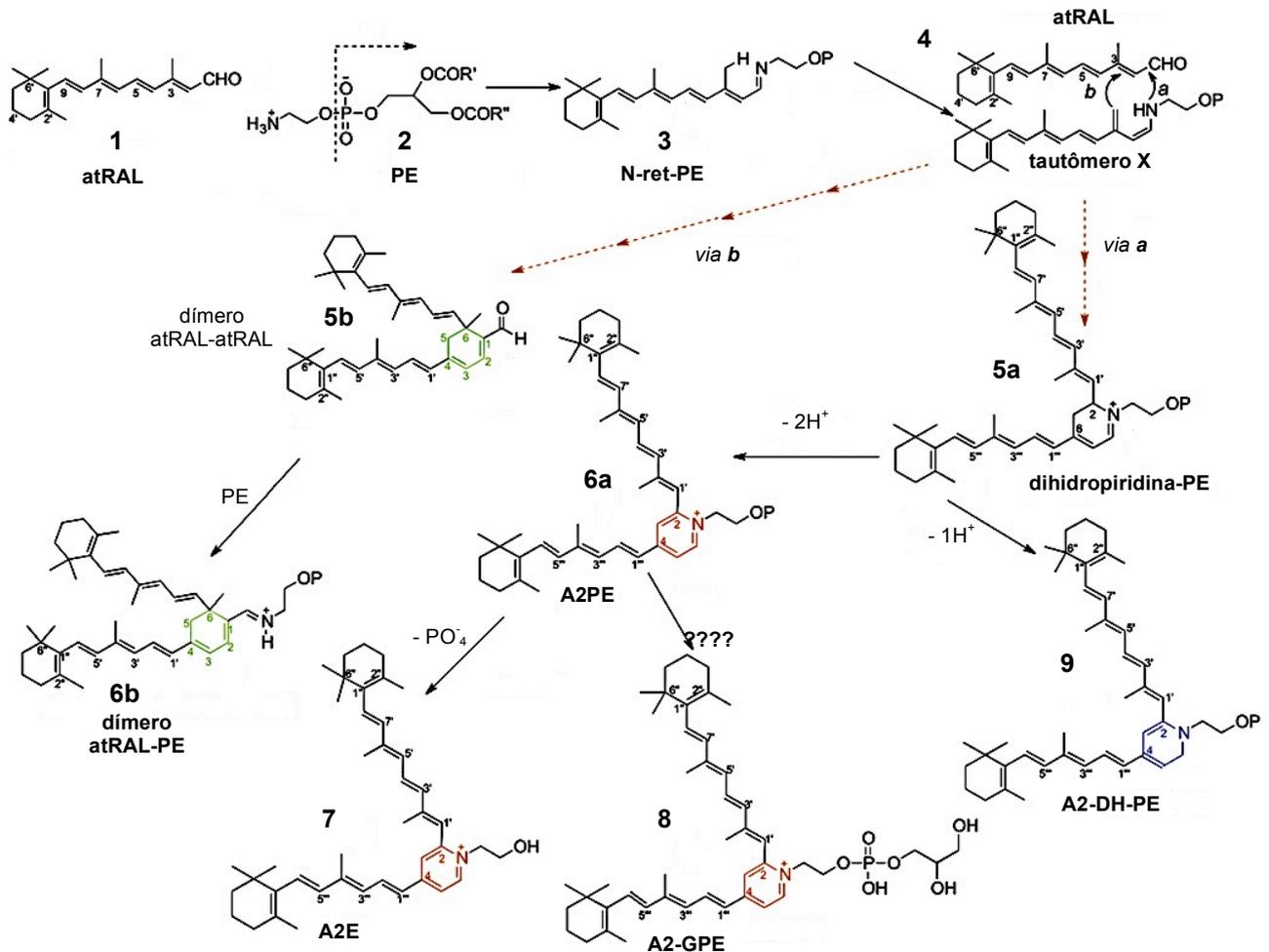


Figura 11 – Via metabólica proposta para a formação dos derivados bisretinoides no ciclo visual. Após a sofrer fotoisomerização nas membranas do segmento externo do fotorreceptor, o retinal todo-trans (1; atRAL) reage com a fosfatidiletanolamina (2; PE) formando o N-retinilideno-fosfatidiletanolamina (3; N-ret-PE). A seguir por isomeria tautomérica aldoenólica surge o tautômero X que ao reagir com uma segunda molécula de atRAL (4) pode seguir por duas vias alternativas: na via *a* a dihidropiridina-PE (5a) formada perderia dois átomos de hidrogênio originado a fosfatidil-piridina (6a; A2PE) que por ação enzimática lisossômica de uma fosfolipase D produz o A2E (7), ou com a perda de somente um hidrogênio a dihidropiridina-PE produziria a A2-dihidropiridina-fosfatidiletanolamina (9; A2-DH-PE); já na via *b*, um dímero de retinal todo-trans seria produzido (5b) com o formação de um anel aromático a partir da tautomerização do N-ret-PE e união com o atRAL (4), então este dímero formaria uma base de Schiff com outra molécula de PE formando o atRAL-PE (6b) (retirado de Sparrow et al., 2012).

A ampla toxicidade das variantes estruturais dos derivados do retinal vem sendo elucidada por experimentos realizados com células do EPR humano cultivadas *in vitro* além dos modelos que utilizam animais cujos genes envolvidos nas reações metabólicas do ciclo visual são nocauteados (SPARROW et al., 2010; BOYER et al., 2012; CHEN et al., 2012; CONLEY et al., 2012).

São notáveis de destaque as formas retinal todo-trans (atRAL) e N-retinilideno-N-retiniletanolamina (A2E) cujo acúmulo nos fotorreceptores ou nas células do EPR está associado com as seguintes alterações: aumento substancial na permeabilidade da membrana citoplasmática (ação detergente), inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial (produção de ATP reduzida), decréscimo na atividade metabólica celular, redução das defesas antioxidantes, produção de dano oxidativo a lipídios e proteínas com ou sem exposição a radiação UV e ao espectro visível (fototoxicidade), inibição da bomba de próton lisossômica, alteração do metabolismo do colesterol, bloqueio da atividade de degradação fagolisossômica sobre os fotorreceptores e, aumento do nível de cálcio citoplasmático e apoptose via ativação da cascata proteolítica das caspases (SIEMS et al., 2002; FINNEMANN et al., 2002; BERGMAN et al., 2004; SPARROW et al., 2009; MAEDA et al., 2009; TSYBOVSKY et al., 2010; WIELGUS et al., 2010; MAEDA et al., 2012; RÓŻANOWSKA et al., 2012).

Nas retinas dos portadores de Stargardt a lipofuscina encontrada é originária a partir de reações não enzimáticas aleatórias entre os derivados desses retinaldeídos. A lipofuscina é constituída por retinoides, lipídios e restos de proteínas que são acumulados nos fagolisossomos do EPR. Análises realizadas nos depósitos de lipofuscina em animais nocauteados para o gene ABCA4 mostraram elevada concentração de retinoides, em especial o A2E. Esta forma predomina os grânulos de lipofuscina em relação às outras espécies diméricas de atRAL. O mesmo vem sendo observado em amostras *post mortem* de EPR de indivíduos com a maculopatia de Stargardt (BEN-SHABAT et al., 2002; MATA et al., 2000; KIM et al., 2007; WU et al., 2009).

A transferência destes cromóforos ao EPR ocorre pela fagocitose diária de 10% do segmento externo dos fotorreceptores, o que promove a completa renovação de toda a sua porção externa em dez dias (PALCZEWSKI, 2010; MOLDAY, 2007). Os efeitos de citotoxicidade relacionados acima ocasionam a morte de células do EPR e trazem como consequência a degeneração de fotorreceptores e perda de visão já que as células do EPR são cruciais para a sobrevivência de células fotorreceptoras. Em particular, por proporcionarem nutrientes para a sobrevivência dos fotorreceptores, além da ingestão e degradação dos discos membranosos envelhecidos como parte do processo de renovação do seu segmento externo.

Normalmente, as membranas desses discos são completamente digeridas pelo sistema lisossomal das células do EPR. No entanto, apesar do bisretinoide A2PE formado nos discos poder ser hidrolisado a A2E e ácido fosfatídico no compartimento do lisossomal, o EPR não tem enzimas capazes de degradar o excesso de A2E. Como resultado o A2E e seus produtos secundários relacionados acumulam-se progressivamente nas células do EPR formando os depósitos fluorescentes de lipofuscina (MOLDAY, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

Em se tratando de degenerações retinianas hereditárias, o comprometimento progressivo da função visual produz um profundo impacto na vida dos indivíduos afetados podendo ocasionar perda de oportunidades de educação e emprego, baixa produtividade e redução substancial da qualidade de vida. Até a presente data não há publicações que tragam informações sobre as variáveis genéticas presentes em sujeitos brasileiros portadores da forma recessiva da maculopatia de Stargardt. Os estudos de variabilidade nucleotídica associados a patologias causadas por alteração de uma determinada função, possibilitam o estabelecimento de uma exata associação entre o genótipo e o fenótipo dos seus portadores. Esta situação possibilita tanto um diagnóstico bem estabelecido como um melhor entendimento preditivo e progressivo da patologia em questão (MOORE; EVANS, 1996).

Esta tese traz como propósito principal a caracterização das variações nucleotídicas presentes num grupo de pacientes portadores da forma autossômica recessiva da maculopatia de Stargardt. Além disso foi investigada a possibilidade do uso das medidas de expressão do gene ABCA4 em leucócitos do sangue periférico como indicador da retinopatia de Stargardt. Também foram analisadas as espessuras das regiões de maior densidade de fotorreceptores do tipo cone nas retinas dos pacientes como indicadores de perda de acuidade visual, e a existência de associações entre estes indicadores genéticos com os dados obtidos por eletrorretinografia de campo total e as informações clínicas apresentadas pelos pacientes.

Dessa maneira, espera-se contribuir ao entendimento da patologia recessiva de Stargardt manifestada por um grupo de paraenses e se possível acrescentar novas informações relativas ao diagnóstico e prognóstico desta retinopatia.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Investigar a ocorrência de associações entre as variantes alélicas e os níveis de expressão do gene ABCA4 com a morfologia dos granulócitos periféricos e os fenótipos clínicos, eletrofisiológicos e de estrutura da retina em pacientes portadores da maculopatia autossômica recessiva de Stargardt.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Caracterizar o fenótipo clínico dos indivíduos diagnosticados com a maculopatia de Stargardt;

- Identificar as variantes alélicas presentes no gene ABCA4 nos indivíduos amostrados;

- Comparar os níveis de expressão do gene ABCA4 nos granulócitos dos indivíduos diagnosticados com a maculopatia de Stargardt e no grupo controle;

- Descrever os estágios de maturação dos granulócitos neutrófilos encontrados na circulação sanguínea periférica entre os grupos de pacientes e controle;

- Avaliar as respostas eletrorretinográficas de campo total dos indivíduos diagnosticados com a maculopatia de Stargardt em função do tempo de adaptação ao claro;

- Comparar as medidas de espessura da região foveal da retina entre os pacientes com maculopatia de Stargardt e o grupo controle.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Os sujeitos participantes da presente pesquisa foram estudados segundo os preceitos da Declaração de Helsinque (1996) observando-se também as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos estabelecidas na Resolução MS/CNS 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde e atualizadas pela Resolução MS/CNS 466/2012. Este projeto foi submetido e recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade do Estado do Pará – UEPA (parecer nº 433.376).

Todos os participantes receberam esclarecimentos sobre os objetivos deste estudo, fornecendo permissão escrita para participar deste trabalho através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

### **4.2 TIPO DE PESQUISA**

O presente estudo caracteriza-se pelo seu caráter experimental objetivando-se o estabelecimento de relações de causa e efeito nas variáveis investigadas. Trata-se de uma investigação de caráter primário de desenho transversal descritivo e analítico (CAMPANA., 1999).

### **4.3 SUJEITOS**

Os pacientes selecionados fazem parte da clientela assistida pelo serviço de oftalmologia do Hospital Universitário Betina Ferro de Souza (HUBFS), pertencente à Universidade Federal do Pará (UFPA). Todos os sujeitos recrutados para o projeto foram clinicamente diagnosticados como portadores da maculopatia de Stargardt de acordo com os resultados dos testes da prática oftalmológica e exames complementares. Para a obtenção de dados relativos aos testes oftalmológicos especializados os pacientes recrutados serão

encaminhados ao Laboratório de Neurologia Tropical do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA (LNT-NMT). As análises relativas a identificação das variantes genóticas e os níveis de expressão da proteína codificada pelo gene ABCA4 serão realizadas em amostras de sangue periférico venoso a ser coletado no LNT.

#### **4.3.1 Critérios de inclusão**

Como definição do fenótipo clínico para a maculopatia de Stargardt e inclusão do paciente nesta pesquisa foram utilizados os seguintes critérios: diminuição da acuidade visual progressiva e bilateral, visão periférica preservada, modo de herança autossômica recessiva, alterações do epitélio pigmentado retiniano com aspecto em bronze batido ou maculopatia em alvo, presença ou não de manchas floculares na retina periférica, e aspecto angiográfico caracterizado por silêncio coroídeo e halo de hiperfluorescência perifoveal.

#### **4.3.2 Critérios de exclusão**

A exclusão de sujeitos ocorreu sempre quando houve dúvida diagnóstica, identificação de uso de medicação de ação retinotóxica, caracterização de degeneração macular relacionada à idade ou outras maculopatias inclusive aquelas ocasionadas por doença sistêmica e opacidade de meios que interferissem na realização de exames.

#### **4.4 AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA**

Os procedimentos descritos a seguir fazem parte da rotina de avaliação oftalmológica e são necessários à caracterização clínica da maculopatia de Stargardt. Além dessas informações os pacientes também foram indagados sobre a ocorrência familiar de alterações visuais e o seu próprio histórico de diminuição da acuidade visual para estimarmos o tempo de duração da maculopatia de Stargardt. Todos esses dados foram obtidos pelos

profissionais oftalmologistas ou não que assistiram os pacientes durante as consultas e procedimentos técnicos realizados no HUBFS e NMT .

Durante a rotina de propedêutica oftalmológica os sujeitos selecionados foram avaliados através dos seguintes procedimentos: exame ocular externo, aferição de pressão intraocular, biomicroscopia de fenda e de fundo de olho, e medida de acuidade visual.

No exame ocular externo avaliou-se através de inspeção sem uso de aparelhos específicos as estruturas mais anteriores do olho e seus anexos. Com o auxílio de uma fonte luminosa foram avaliados os seguintes itens: posição do globo ocular e da fenda interpalpebral, pele e bordas palpebrais, conjuntiva bulbar, carúncula, conjuntiva tarsal, limbo esclero-corneal, córnea, câmara anterior, íris e pupila.

A aferição da pressão intraocular da área central da córnea foi realizada com o tonômetro e Goldman acoplado à lâmpada de fenda de Haag-Streit 900, sob anestesia tópica por cloridrato de proximetacaína a 0,5% (Anestalcon®/Alcon®).

Realizado também com a fonte luminosa em fenda, a biomicroscopia permitiu a obtenção de imagens em cortes ópticos de diferentes formas, inclinações e intensidades, o que possibilitou a observação das estruturas transparentes do olho em aumento de 6 a 40 vezes. O sistema ainda é composto por filtros para cores e lentes variadas que permitem ajustes de direção e intensidade do foco luminoso (RODRIGUES, 1996). Nas análises dos sujeitos Stargardt foram utilizados os métodos de iluminação direta vermelho e corte óptico, de rotina, acrescentando-se, desde que necessários, outros padrões de exame.

O exame de fundo de olho (fundoscopia) foi conduzido sob midríase obtida com duas gotas de colírio midriático contendo tropicamida a 1% (Mydriacyl Alcon®) administradas com cinco minutos de intervalo cada. Os procedimentos utilizados foram os de oftalmoscopia binocular indireta para a visualização de toda a retina, e de biomicroscopia de fundo com lâmpada de fenda e lente para avaliação mais detalhada da região macular.

Nas determinações de acuidade visual (AV) foram empregados os optótipos de

Snellen, cujos símbolos de base literal são dispostos em ângulos de 1 minuto de arco. O procedimento obedeceu a graduação de tamanho dos optótipos, iniciando-se com o maior (correspondente à AV de 0,05) até o de menor tamanho (AV de 1), mantendo-se uma distância de 20 pés (ou 6,1m) entre o paciente e o plano de projeção dos optótipos. A identificação correta dos optótipos representa a melhor acuidade visual do sujeito investigado. Esta identificação foi realizada com os valores em escala imperial, posteriormente convertidos para a escala LogMAR, e considerando-se o resultado da refratometria prévia que representa uma estimativa da capacidade da função visual.

#### 4.5 AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA COMPLEMENTAR

Para a avaliação mais especializada os sujeitos foram submetidos aos exames complementares de retinografia, angiofluoresceínografia, tomografia de coerência óptica retiniana (TCOR), e eletrorretinografia de campo total (ffERG).

##### 4.5.1 Retinografia e Angiofluoresceínografia

Na retinografia e angiofluoresceínografia são obtidos registros fotográficos do fundo do olho com o objetivo de identificar alterações macroscópicas na morfologia retiniana. Estas alterações morfológicas foram utilizadas para o estabelecimento do fenótipo clínico dos sujeitos em estudo de acordo com descrição em quatro estágios proposta por Fishman et al. (1976). Para esta classificação são considerados essencialmente o tamanho e a localização das manchas floculares amarelo-esbranquiçadas assim como as alterações no epitélio pigmentado retiniano e lesões no córiocapilar.

Para a coleta de imagens foi empregado o sistema de captura de imagens Visucam® 500 (Carl Zeiss Meditec, Inc.) após a administração de colírio midriático (Mydriacyl Alcon®). Para o estudo macroscópico da dinâmica do fluxo sanguíneo (perfusão) na

vasculatura retiniana utilizou-se como contraste o corante orgânico a fluoresceína sódica a 10% por via intravenosa por acessos no dorso da mão ou antebraço.

Estes métodos permitem o imageamento topográfico da retina possibilitando a identificação de depósitos de lipofuscina e outros fluoróforos na monocamada de células do epitélio pigmentado retiniano (EPR). A ocorrência destes depósitos está associada ao envelhecimento natural do epitélio em questão, contudo, também caracterizam estados patológicos da retina externa (SCHMITZ-VALCKENBERG et al., 2008).

A lipofuscina é composta por uma mistura complexa de lipídios e proteínas parcialmente digeridos cuja composição precisa ainda é desconhecida. Sabe-se contudo que seu principal componente é a forma A2E que é derivada de duas reações sucessivas entre moléculas de retinal todo-trans com a fosfatidiletanolamina. Este material apresenta alto grau de fluorescência com predominância de formas bisretinoides (BOYER et al., 2012a).

#### **4.5.2 Tomografia de Coerência Óptica Retiniana (TCOR)**

A tomografia de coerência óptica retiniana é um método não invasivo utilizado como ferramenta diagnóstica, sem o contato com estruturas oculares e, capaz de fornecer imagens em corte transversal do olho humano em tempo real (HUANG et al., 1991).

A TCOR nos permite a visualização de estruturas intrarretinianas, em especial o EPR bem como as junções dos segmentos internos e externos da camada de fotorreceptores geralmente afetados nos estágios iniciais nas degenerações da retina (ZAWADZKI et al., 2005). O imageamento em secção transversal da mácula ou da cabeça do nervo óptico é análogo àquele de uma ultrassonografia pelo uso de ondas de luz para a obtenção de perfis refletivos dos tecidos em investigação (HUANG et al., 1991).

As medidas de espessura da região central da fóvea retiniana foram obtidas usando o tomógrafo Spectralis® HRA + OCT (Heidelberg Engineering Inc., Alemanha). O

Spectralis usa um laser de comprimento de onda de 870 nm, fornece 40000 A scans/s com uma resolução axial de 7  $\mu\text{m}$  e transversal de 14  $\mu\text{m}$  nos tecidos analisados. O rastreamento do *scan* cobriu uma área de 20° x 20° consistindo em 37 linhas de alta resolução espacial. O programa Heidelberg Eye Explorer foi usado para capturar as imagens e fazer as análises de espessura da fóvea nos sujeitos portadores da maculopatia de Stargardt e em controles. Múltiplas imagens da retina central (30 imagens) serão promediadas para melhorar a razão sinal ruído. O critério de aceitação da qualidade de imagem será baseado em um score do programa, o qual deverá ser superior a 16.

Os valores encontrados foram tabulados e as médias estimadas dentro de cada um dos grupos e entre os dois, e as diferenças encontradas testadas através dos testes *t* (Student) e *U* (Mann-Whitney), ambos disponíveis no programa gratuito BioEstat v5.3 (AYRES et al., 2007).

#### **4.5.3 Avaliação do Aumento da Amplitude do Eletrorretinograma de Campo Total em Função do Tempo de Adaptação ao Claro**

A eletrorretinografia (ERG) representa a resposta elétrica detectável que a retina produz em reação a um estímulo luminoso. Este estímulo pode ser modulado como um padrão em repetições estruturadas espacialmente ou de maneira estática através de um flash. A resposta obtida pode ser representativa de toda a retina ou parte dela (GUNDOGAN et al., 2011).

O eletrorretinograma de campo total (*full-field ElectroRetinoGram – ffERG*) consiste na captação da resposta elétrica difusa neural e não neural da retina estimulada por flashes luminosos. Nesta estimulação toda a área da retina correspondente ao campo visual do sujeito é ativada (BIRCH; ANDERSON, 1992). A medida desta resposta corresponde a soma

total dos componentes positivos e negativos originados pelos diferentes estágios de processamento retiniano ao longo do tempo de estimulação (GUNDOGAN et al., 2011).

A preparação dos sujeitos para o teste iniciava com dilatação pupilar com uma gota de cloridrato de tropicamida a 1% (Mydracyl®/Alcon®) afim de alcançarmos a maior estimulação dos fotorreceptores. Ambos os olhos também foram anestesiados com cloridrato de proximetacaína a 0,5% (Anestalcon®/Alcon®) minimizando o desconforto causado pelo eletródio utilizado nos registros eletrorretinográficos. Após esta etapa de instilação destes colírios, houve o posicionamento dos eletródios para obtenção dos dados, sendo: um eletródio corneano DTL ativo (situado à porção inferior da córnea), um eletródio de superfície de disco de ouro usado como referência (posicionado temporalmente e ipsolateral ao olho testado) e, outro também de disco de ouro usado para aterramento (aplicado no ponto encefalográfico Fpz). Para a eliminação da resistência elétrica natural da pele, haverá esfoliação com gel abrasivo cutâneo (NuPrep® - D.O. Weaver and Company) nos pontos de fixação dos eletródios, além de pasta eletrolítica (Ten20® - D.O. Weaver and Company) para melhor condução dos sinais. Antes do início dos registros houve a adaptação ao escuro em ambos olhos por um período de 20 minutos. Serão usados tapa-olhos opacos para evitar a exposição do olho à luz.

Os registros dos sinais eletrorretinográficos capturados eram enviados ao amplificador Grass 15 LT (GRASS Technologies – Warwick, Rhode Island, USA) seguidos de digitalização em placa PCI em um microcomputador tipo Workstation (Apple) utilizando-se o software Veris System v6.0.10 (Electro-diagnostic Imaging (EDI) – Redwood City, Califórnia, EUA). Os sinais foram amplificados de 10.000 vezes e filtrados entre as frequências de 0,3 a 300 Hz.

Após a adaptação ao escuro, o sujeito testado foi colocado em um estimulador do tipo Ganzfeld comandado pelo sistema Veris Science v6.10. O estimulador apresentava

uma iluminação de fundo de 30 cd/m<sup>2</sup>. Os estímulos eram formados por flashes (duração de 1 ms) de luz com 3 cd/m<sup>2</sup> acima da luminância de adaptação do fundo. Os flashes eram liberados a cada 10 s. O registro foi realizado durante 20 minutos, totalizando 120 registros, a partir do início da adaptação ao claro.

A análise das respostas eletrorretinográficas obtidas foi feita através das medidas de amplitude da onda b do ERG de campo total em função do tempo de adaptação ao claro. Os dados obtidos foram ajustados a um modelo exponencial, conforme a seguinte equação:  $y = a + b \times \exp(-t/\tau)$ , que permite o cálculo da constante de tempo da função, a qual representa o tempo de adaptação ao claro do sujeito (PEACHEY et al., 1989). Nesta equação temos  $y$  representando o parâmetro a ser achado no modelo,  $a$ ,  $b$ , e  $t$  são parâmetros de escalonamento e  $\tau$  é a constante de tempo. Os valores da constante de tempo dos pacientes foram comparados aos valores de um grupo controle pareado em idade.

#### 4.6 GENOTIPAGEM

Desde a identificação das primeiras variantes alélicas associadas a doença de Stargardt feita por Allikmets et al. (1997) mais de trezentas publicações foram produzidas descrevendo centenas de mutações no gene ABCA4. As mutações descritas encontram-se essencialmente nas regiões codificantes (éxons) do gene ABCA4 e naquelas flangeadoras envolvidas no processamento/edição (*splicing*) do RNA mensageiro que serve de molde para a síntese da proteína ABCA4 (FUJINAMI et al., 2013; STROM et al., 2013).

As análises realizadas em consórcios de pacientes em diversas etnias determinaram a ocorrência de mais de 500 diferentes mutações associadas ao fenótipo clínico da maculopatia de Stargardt. Estas variantes são em sua grande maioria mutações pontuais que provocam mudanças de aminoácidos na proteína codificada, além de inserções e deleções nas regiões codificantes (éxons) do gene ABCA4. Esta imensa gama de variabilidade torna

extremamente difícil a identificação das reais variantes alélicas, e respectivas combinações, causadoras da patologia de Stargardt (MAIA-LOPES et al, 2009; BURKE et al., 2013).

A metodologia utilizada para a genotipagem dos sujeitos amostrados envolveu as etapas de (i) obtenção e quantificação de DNA genômico, (ii) amplificação das regiões codificantes do gene ABCA4 através de reação em cadeia da polimerase, (iii) purificação e quantificação dos amplicons obtidos, (iv) reação de sequenciamento dos amplicons e posterior purificação para leitura e determinação da sua composição nucleotídica.

#### **4.6.1 Obtenção e quantificação de DNA genômico**

A determinação dos perfis genotípicos dos sujeitos investigados foi realizada a partir da obtenção de 100 ng de DNA extraídos da camada leucocitária separada por centrifugação, a 3000 rpm por 15 minutos, do sangue total coletado com anticoagulante.

O DNA foi extraído através de protocolo padrão sugerido pelo fabricante do kit de extração de DNA genômico Ilustra™ Blood GE genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®). O protocolo consiste na precipitação de DNA genômico a partir de 300 ul de sangue total, com uma etapa inicial de lise celular, seguida de digestão e precipitação de proteínas com adsorção seletiva em membrana de sílica e posterior eluição do DNA em 30 ul de solução tamponante com baixo teor salino (solução estoque).

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando-se 2 ul da solução estoque através da razão entre as faixas de absorbância do UV 260/280 nm conforme as recomendações do fabricante (NanoVue Plus™ Spectrophotometer GE Healthcare®).

#### **4.6.2 Amplificação das Regiões Codificantes do Gene ABCA4**

A metodologia de amplificação gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada conforme o descrito por Azarian et al. (1998), englobando os 50 éxons do

gene ABCA4, além de parte das regiões a jusante e a montante destes fragmentos. O protocolo padrão de amplificação continha as seguintes temperaturas e tempos de ciclagem: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos repetidos em sequência a 95 °C por 20 segundos, 40 segundos para pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores cujas temperaturas variavam conforme a região a ser amplificada, e 40 segundos de extensão a 72 °C; em seguida havia um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos e, fechamento da reação com as amostras mantidas a 4 °C.

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas em um volume de solução tampão de reação para a enzima Taq polimerase 1X concentrado, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 uM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq polimerase, 100 ng de DNA genômico e água pura em quantidade suficiente para um volume final de 50 ul.

#### **4.6.3 Purificação e Quantificação dos Amplicons Obtidos**

Após a reação de PCR os amplicons eram visualizados em gel de agarose a 2% através de eletroforese submarina com tampão TAE 1X concentrado. Para a marcação, visualização e registro fotográfico deste fragmentos utilizamos o corante fluorescente GelRed™ Biotium® detectável sob iluminação UV a 300 nm.

O protocolo de purificação seguido utilizou a tecnologia de ligação do DNA em coluna contendo membrana de sílica, com posterior lavagem e eluição através soluções tamponantes por centrifugação em conformidade às recomendações do fabricante do kit GenElute™ PCR Clean-Up (Sigma-Aldrich®). A quantificação dos amplicons para posterior sequenciamento foi realizada por espectrofotometria utilizando-se 2 ul do volume purificado através da razão entre as faixas de absorbância do UV 260/280 nm conforme as recomendações do fabricante (NanoVue Plus™ Spectrophotometer GE Healthcare®).

#### 4.6.4 Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento dos 50 amplicons gerados utilizamos a metodologia dideoxyterminal de Sanger et al. (1977), adaptada ao uso destes nucleotídeos modificados e marcados com fluoróforos, com os respectivos eletroferogramas obtidos através de leitura automatizada por eletroforese capilar no analisador genético modelo 3130 da Applied Biosystems®.

O protocolo para a obtenção das sequências nucleotídicas possuía uma etapa inicial com a reação de sequenciamento propriamente dita utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies®/Applied Biosystems®). O volume final total era de 20 µl de reação contendo: 4 µl do reagente *Terminator Ready Reaction Mix*, 30 ng do amplicon purificado, 3,2 pmol de cada uma dos oligonucleotídeos havendo ao final ajuste com água ultrapura deste volumes para o total mencionado.

Para cada um dos iniciadores eram realizadas reações separadas para a confirmação da composição nucleotídica em ambas as fitas de DNA. a jusante e a montante. O protocolo padrão de termociclagem para o sequenciamento possuía uma etapa inicial a 96 °C por 60 segundos, seguida de 25 ciclos com 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 10 segundos e 60 °C por 4 minutos, e finalizando com a manutenção das amostras a 4 °C.

Os produtos da reação acima eram então purificados adicionando-se 2 µl de EDTA (125 mM) e 2 µl de acetato de sódio (3 M, pH 4,8) seguidos de 50 µl de álcool etílico absoluto. Esta mistura era agitada e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm, e desprezando-se o sobrenadante ao final. Na próxima etapa foram adicionados 70 µl de etanol a 70% com centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm, seguindo-se mais uma vez ao descarte do sobrenadante. O precipitado obtido secava em estufa a 50 °C por 20 minutos, e era reconstituído em 10 µl de formamida sob agitação por 15 segundos e aquecido a 95 °C por 3 minutos para aplicação no sequenciador.

#### 4.6.5 Edição e Análise dos Éxons do Gene ABCA4

As sequências nucleotídicas constituintes dos éxons analisados foram avaliadas quanto a sua qualidade através do software Sequence Scanner v1.0 (Life Technologies®/Applied Biosystems®), e em seguida alinhadas e editadas através do software gratuito BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999).

Após o alinhamento que permite a identificação das mutações nos fragmentos sequenciados, a confirmação das variantes nucleotídicas detectadas foi realizada através da comparação com as bases de dados abaixo informadas:

- Retina International: <http://www.retina-international.org/files/sci-news/abcrmut.htm>;
- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST): [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome);
- ABC mutation database: <http://abcmutations.hegelab.org/proteinDetails?pid=81>;
- RetinoGenetics: [http://122.228.158.106/RetinoGenetics/stargardt\\_diagnosis.php](http://122.228.158.106/RetinoGenetics/stargardt_diagnosis.php);
- NCBI Variation Viewer: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=CFH>;
- Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.

#### 4.7 MEDIDAS DE EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ABCA4

A quantificação do nível de expressão de um gene está fundamentada na determinação do volume total de RNA mensageiro, relativa a este gene, que é detectável na célula ou tecido em questão com elevada especificidade e sensibilidade (SCHEFE et al., 2006). As medidas de expressão do gene ABCA4 foram realizadas através da metodologia de amplificação de fragmentos de ácidos nucléicos por reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica utilizada será a de PCR quantitativo em tempo real (q-rtPCR) (HIGUCHI et al., 1992).

O protocolo utilizado foi adaptado daquele descrito por Schmittgen e Livak (2008) que é composto pelas seguintes etapas: 1. isolamento do RNA mensageiro (RNAm); 2.

Tratamento com DNase; 3. síntese de cDNA; 4. reação de rt-qPCR e, 5. determinação da eficiência da reação de quantificação.

#### **4.7.1 PCR Quantitativo em Tempo Real (q-rtPCR)**

A técnica de q-rtPCR é fundamentada nas premissas da amplificação exponencial de fragmentos de ácidos nucleicos com um diferencial: é possível a determinação das quantidades de fragmentos amplificados no tempo exato em que isto ocorre, ou seja, em cada um dos ciclos completados. Este processo é totalmente automatizado permitindo a determinação precisa das quantidades de um gene em expressão no material biológico sob investigação (HEID et al., 1996).

O ponto crítico para a quantificação da expressão de um gene é conhecido como ciclo limiar (Ct) ou ciclo de quantificação (Cq), que por definição representa pontualmente o ciclo de amplificação dos fragmentos em estudo no qual o sinal fluorescente cruza um limiar de detecção previamente definido. Ou seja, o primeiro ciclo no qual a fluorescência emitida pelo marcador indica que os produtos de PCR tornaram-se detectáveis .

Foi utilizada a técnica de q-rtPCR para teste da hipótese de que alterações no gene ABCA4 expresso na retina dos pacientes com maculopatia de Stargardt possam ser espelhadas nas células da circulação sanguínea periférica. O protocolo para a determinação dos níveis de expressão gênica por q-rtPCR iniciava com a extração do RNA total a partir de 250 ul da camada de leucócitos obtida por centrifugação a 3500 rpm da amostra de sangue total coletada por punção venosa periférica. Estas células eram homogeneizadas com o reagente TRI Reagent® Solution (Life Technologies®/Applied Biosystems®) para a preservação da estrutura dos RNAs conforme as orientações do fabricante. A seguir a fração de RNA total foi isolada por precipitação alcóolica e estocado sob congelamento em 20 ul de água ultra pura.

Na próxima etapa o RNA total isolado servia como molde para a reação de síntese de moléculas de DNA complementar (cDNA) específicas ao gene ABCA4. Para esta reação seguiu-se as recomendações contidas no kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Life Technologies®/Applied Biosystems®) para amplificação termocíclica do fragmento do gene ABCA4. As reações foram realizadas em micropalacas ópticas contendo um volume final de 40 µl sendo a metade composta pelos reagentes contidos no kit (tampão, oligonucleotídeos randômicos, dNTPs e a enzima transcriptase reversa) ao qual era adicionado um volume de 20 µl do RNA total extraído. Os ciclos de temperatura para esta amplificação foram de: 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e finalizando a 85 °C por 5 minutos.

A etapa final também consistia em uma amplificação por PCR com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos do tipo TaqMan®, referência HS00979594\_m1 (Life Technologies®/Applied Biosystems®), que permitem a detecção de fluorescência ocasionada pela atividade exonucleotídica 5'→3' da Taq DNA polimerase durante reação de amplificação termocíclica. Esta reação tinha um volume final de 30 µl contendo os reagentes do kit TaqMan® (*master mix e gene expression assay*) além de água ultra pura e 3 µl do DNA obtido na reação de transcrição reversa. Os ciclos de temperatura utilizados foram de 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos repetidos em sequência a 95 °C por 25 minutos e 60 °C por 1 minuto no termociclador ABI Prism® 7000 (Applied Biosystems®).

Ao final desta amplificação temos um aumento exponencial da intensidade de fluorescência até o ponto do limiar de detecção, onde temos o estabelecimento de uma relação inversa entre o número de moléculas iniciais de DNA presentes na reação e o valor Ct, que serve de base para os cálculos quantitativos na reação de q-rtPCR (ALONSO et al., 2003).

#### 4.7.2 Análise da Expressão do Gene ABCA4 por q-rtPCR

Os valores de Ct obtidos foram utilizados para a quantificação relativa do gene ABCA4 através da análise comparativa aos valores obtidos para o proto-oncogene constitutivo ABL cuja expressão codifica uma proteína tirosina quinase, de ação tanto citoplasmática quanto nuclear, envolvida em diversos processos celulares que incluem divisão, diferenciação, adesão e resposta celular ao estresse (WANG, 2014).

De posse dos valores de Ct para ambos os genes no grupo de sujeitos com a maculopatia de Stargardt e no grupo controle, os níveis de expressão foram calculados para cada sujeito através da equação  $2^{-\Delta Ct}$  onde o valor de  $\Delta Ct$  é dado por  $Ct_{(ABCA4)-2} - Ct_{(ABL)}$  (Schmittgen; Livak, 2008). A seguir a média aritmética dos valores encontrados foi determinada para cada um dos dois grupos e o teste *U* (Mann-Whitney) utilizado para avaliarmos as diferenças encontradas. Todos estes dados foram tabulados e analisados em planilhas do programa gratuito de análise estatística BioEstat v5.3 (AYRES et al., 2007).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA SEGMENTAÇÃO NUCLEAR DOS NEUTRÓFILOS

Os granulócitos neutrófilos representam de 40 a 70% dos leucócitos circulantes em um indivíduo adulto sendo encontrados a uma concentração média de cinco bilhões por litro de sangue (HOFFBRAND et al., 2006). A produção destes granulócitos ( $1$  a  $2 \times 10^{11}$  células/dia) corresponde quantitativamente à maior atividade hematopoiética da medula óssea, onde aproximadamente dois terços da atividade formadora de células está direcionada a mielopoiese (BORREGAARD, 2010).

Antes de invadirem a corrente sanguínea os neutrófilos passam por um processo de diferenciação terminal no qual surgem células cujos núcleos apresentam-se bastonados e segmentados. Esta maturação é dependente do microambiente hematopoiético e mediada por fatores de transcrição intrínsecos (GERY et al., 2004; IWASAKI et al., 2005).

Diversos estudos tem demonstrado o papel dos retinoides na indução da diferenciação celular hematopoiética (WARD et al., 2000; BROWN; HUGHES, 2012). Por ser um transportador de retinoides, testaremos a hipótese de que alterações na estruturação da proteína ABCA4 também possam ser evidenciadas através da contagem da segmentação dos lóbulos dos neutrófilos.

Para a análise dos segmentados parte do sangue coletado com o anticoagulante EDTA foi utilizada para a preparação de esfregaços corados pela técnica de May-Grünwald/giemsa. A contagem foi realizada manualmente em microscópio óptico (1000X) até que o total de 100 neutrófilos seja alcançado. Os valores obtidos foram então utilizados para a determinação das médias e desvios para cada conjunto de morfotipos identificados e, em seguida as diferenças quantitativas encontradas foram avaliadas através do teste U (Mann-Whitney) executado no programa de análise estatística BioEstat v5.3 (AYRES et al., 2007).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

No total onze pacientes atendidos no serviço de oftalmologia do HUBFS com o diagnóstico para distrofia macular de Stargardt foram identificados e convocados a participar de forma voluntária deste estudo. Cada um destes sujeitos foram entrevistados durante as consultas oftalmológicas para verificação dos critérios de inclusão e exclusão propostos, e também, para levantamento de histórico familiar e estimativa de manifestação dos primeiros sinais de perda de acuidade visual.

Entre os sujeitos avaliados houve somente um caso de relação consanguínea detectado entre dois pacientes irmãos. Contudo, ambos não relataram a ocorrência de outros familiares com quando clínico que sugerisse a maculopatia de Stargardt. Nos demais não houve informações que indicassem a ocorrência em outros membros familiares. Todos os participantes eram residentes da região metropolitana de Belém. No grupo de pacientes havia sete sujeitos (64%) do sexo masculino e quatro (36%) do sexo feminino. A idade média foi de 34,5 anos (DP  $\pm$  14,17) e variação de 15 a 54 anos. Não foram detectadas anormalidades morfológicas nos exames da rotina oftalmológica em todos os aspectos observados quanto as estruturas anteriores dos olhos se seus anexos. O mesmo ocorrendo para os resultados dos exames de pressão intraocular com média de 12 mmHg, e biomicroscopia sem alterações em ambos os olhos avaliados.

A Tabela 2 apresenta as informações clínicas dos sujeitos avaliados quanto a idade, sexo, estágio clínico, década de surgimento e medidas de acuidade visual (AV) realizadas no período de 2013 a 2014. Os valores de AV foram medidos em ambos os olhos (22 ao todo) com média estimada de 20/200 (LogMAR 1,0), e com variação entre 20/100 (LogMAR 0,7) e 20/800 (LogMAR 1,6). Em todos os casos não houve melhora dos valores com a correção visual. A década em que houve a percepção de alterações na função visual

(dificuldade ou diminuição do campo de visão central), obtida através do relato individual dos sujeitos avaliados, foi estimada como o momento do surgimento da maculopatia.

Sujeito	Informações clínicas					AV	
	Idade	Sexo	Estágio	Década de surgimento	Tempo de duração (anos)	OD (logMAR)	OE (logMAR)
STG01	27	♀	II	2a	17	20/160 (0,9)	20/160 (0,9)
STG02	32	♂	I	2a	12	20/100 (0,7)	20/100 (0,7)
STG03	15	♂	II	1a	5	20/100 (0,7)	20/100 (0,7)
STG04	17	♂	III	1a	7	20/400 (1,3)	20/400 (1,3)
STG05	39	♂	II	3a	9	20/100 (0,7)	20/100 (0,7)
STG06	54	♀	III	4a	14	20/400 (1,3)	20/400 (1,3)
STG07	43	♀	III	3a	13	20/100 (0,7)	20/160 (0,9)
STG08	53	♂	III	3a	23	20/400 (1,3)	20/800 (1,6)
STG09	26	♂	III	2a	6	20/200 (1,0)	20/100 (0,7)
STG010	50	♀	III	4a	10	20/200 (1,0)	20/300 (1,2)
STG011	23	♂	III	1a	13	20/400 (1,3)	20/400 (1,3)

Tabela 2 – Dados obtidos em entrevista com os pacientes e medidas de acuidade visual (AV) para ambos os olhos (OD - olho direito; OE – olho esquerdo).

O tempo de comprometimento da função visual dos sujeitos portadores da maculopatia de Stargardt foi estimado subtraindo-se o valor da idade atual do paciente pelo valor referente ao início da década de surgimento (10, 20, 30 ou 40 anos). Estes valores estão dispostos na Tabela 2 e foram utilizados para avaliação da associação entre o tempo de ocorrência da maculopatia com a redução da AV apresentada pelos sujeitos.

Nesta avaliação, o resultado obtido indica haver correlação positiva ( $r = 0,47$ ;  $p=0,02$ ) entre o tempo e a AV, ou seja, quanto maior duração da doença, pior acuidade em logMAR e vice-versa (Figura 12). Este valor é ainda maior ( $r = 0,69$ ;  $p=0,1$ ) se a estimativa

for realizada somente entre os três indivíduos com os inícios mais precoces (até o final da 1ª década) da maculopatia.

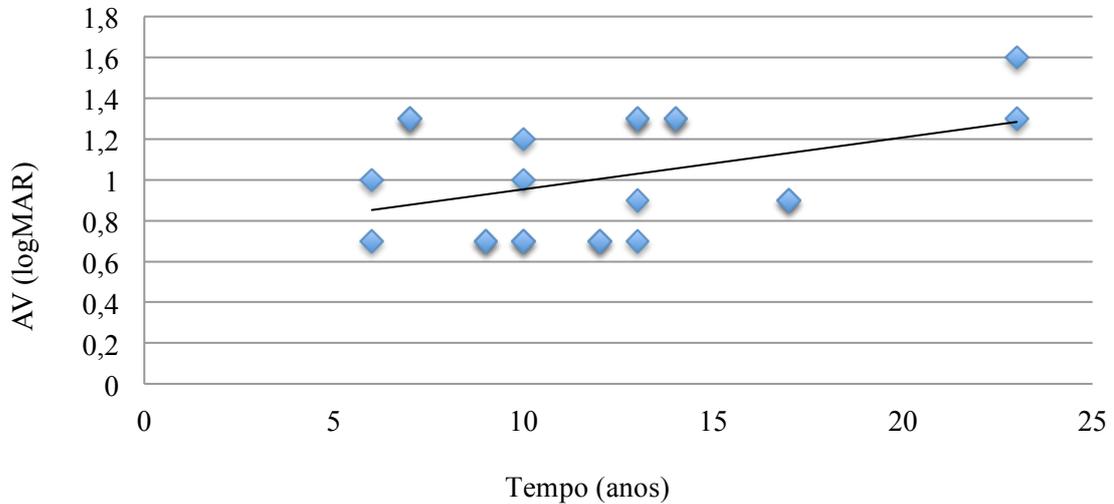


Figura 12 – Correlação observada entre o tempo de acometimento pela maculopatia de Stargardt e a diminuição da AV. Vale ressaltar que valores positivos de AV em logMAR representam redução de acuidade visual.

## 5.2 AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA COMPLEMENTAR

Os exames de retinografia e angiofluoresceínografia foram realizados como parte do procedimento padrão para a confirmação diagnóstica da ocorrência da maculopatia de Stargardt nos sujeitos participantes do estudo.

Em todos os casos as imagens retinográficas possibilitaram a identificação das alterações morfológicas típicas na região macular, tais como: a presença de manchas floculares amarelo-esbranquiçadas, aspecto morfológico em forma de bronze batido, maculopatia em forma de alvo, e atrofia do EPR.

Nos registros fotográficos do fundo dos olhos adquiridos após a administração intravenosa de fluoresceína sódica, foi possível a detecção mais detalhada da localização e extensão das lesões por acúmulo de lipofuscina no EPR.

Esta abordagem possibilitou a observação de um maior número de manchas floculares indetectáveis ao exame de fundo de olho convencional. Com base nestes resultados foi estabelecida a classificação dos estágios de manifestação da maculopatia de Stargardt conforme o proposto por Walia e Fishman et al (2009) (Tabela 2).

As imagens angiográficas confirmaram a ocorrência de modificações na aparência foveal em diferentes estágios do comprometimento retiniano, observando-se pequenas alterações reveladas pela presença de manchas floculares pontuais e distribuídas ao redor da mácula, progredindo para a aparência do metal bronze batido (estágio I – sujeito STG02) (Figura 12); seguidas de aumento nas áreas de ocorrência das manchas para fora da região foveolar, indo em direção e ultrapassando os arcos vasculares, chegando até a porção nasal em relação ao disco óptico (estágio II – sujeitos STG01, STG03 e STG05) (Figuras 13 e 14); na condição mais avançada de degeneração foi constatada a presença de áreas hipofluorescentes irregulares (silêncio coroideo) com atrofia do EPR, além da reabsorção de manchas floculares (estágio III – sujeitos STG04, STG06, STG07, STG08, STG09, STG010 e STG011) (Figura 15). Não foram identificados sujeitos apresentando danos nas camadas celulares retinianas característicos do estágio IV.

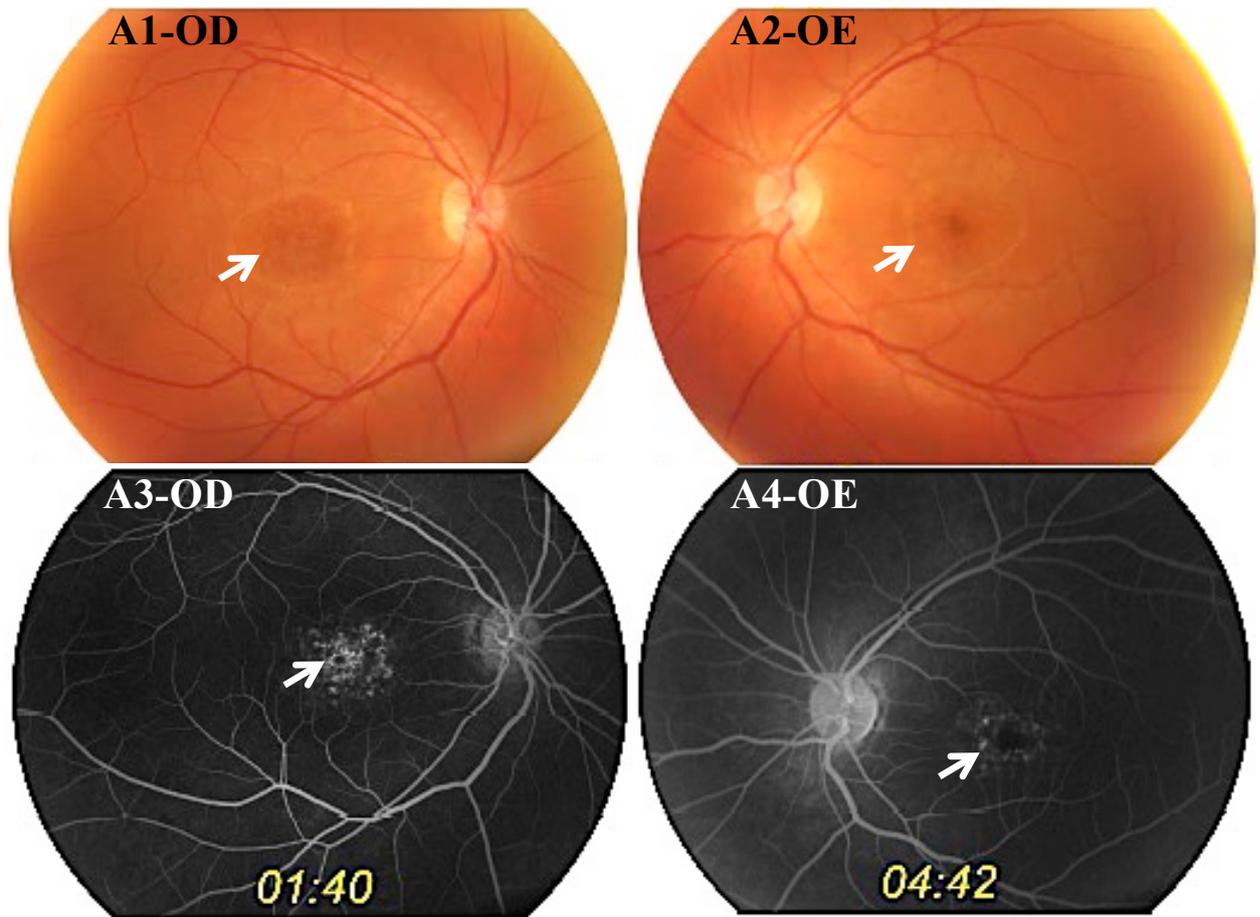


Figura 13 – Retinografias (A1 – A2) e angiografias (A3 - A4) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG02 no estágio I. As manchas floculares indicadas pelas setas estão presentes somente na região delimitada pelos arcos vasculares e restritas ao espaço perifoveal na região macular.

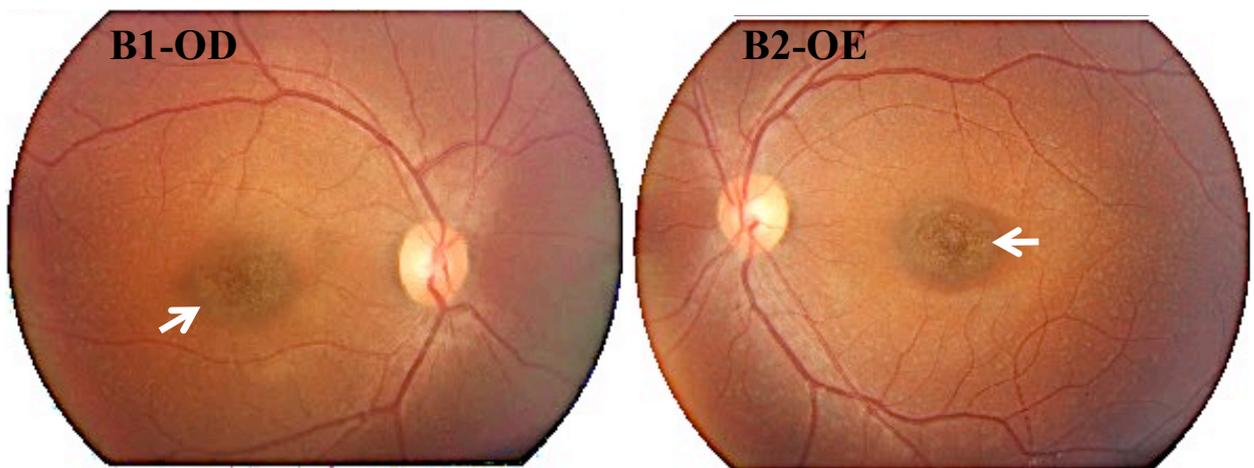


Figura 14 – Retinografias (B1 - B2) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG03. As setas indicam a aparência macular em alvo. Como característica do estágio II também pode ser observada a maior distribuição das manchas pontuais chegando além dos arcos vasculares.

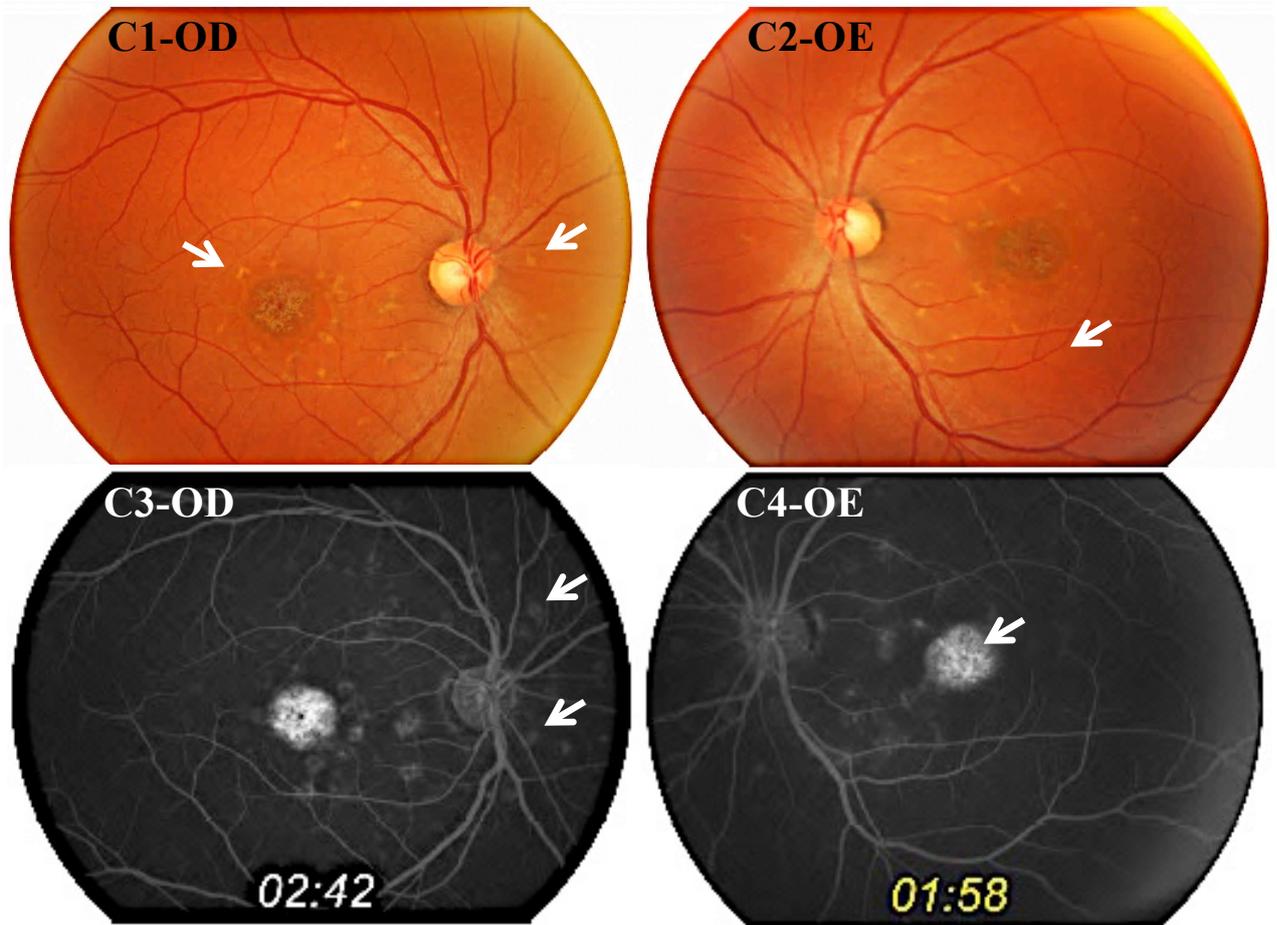


Figura 15 – Retinografias (C1 - C2) e angiografias (C3 - C4) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG05. Sujeito também apresentando o estágio II com extensa área (escura) de hipofluorescência coroidal. As setas indicam a aparência macular em alvo hiperfluorescentes e manchas distribuídas na porção nasal da retina.

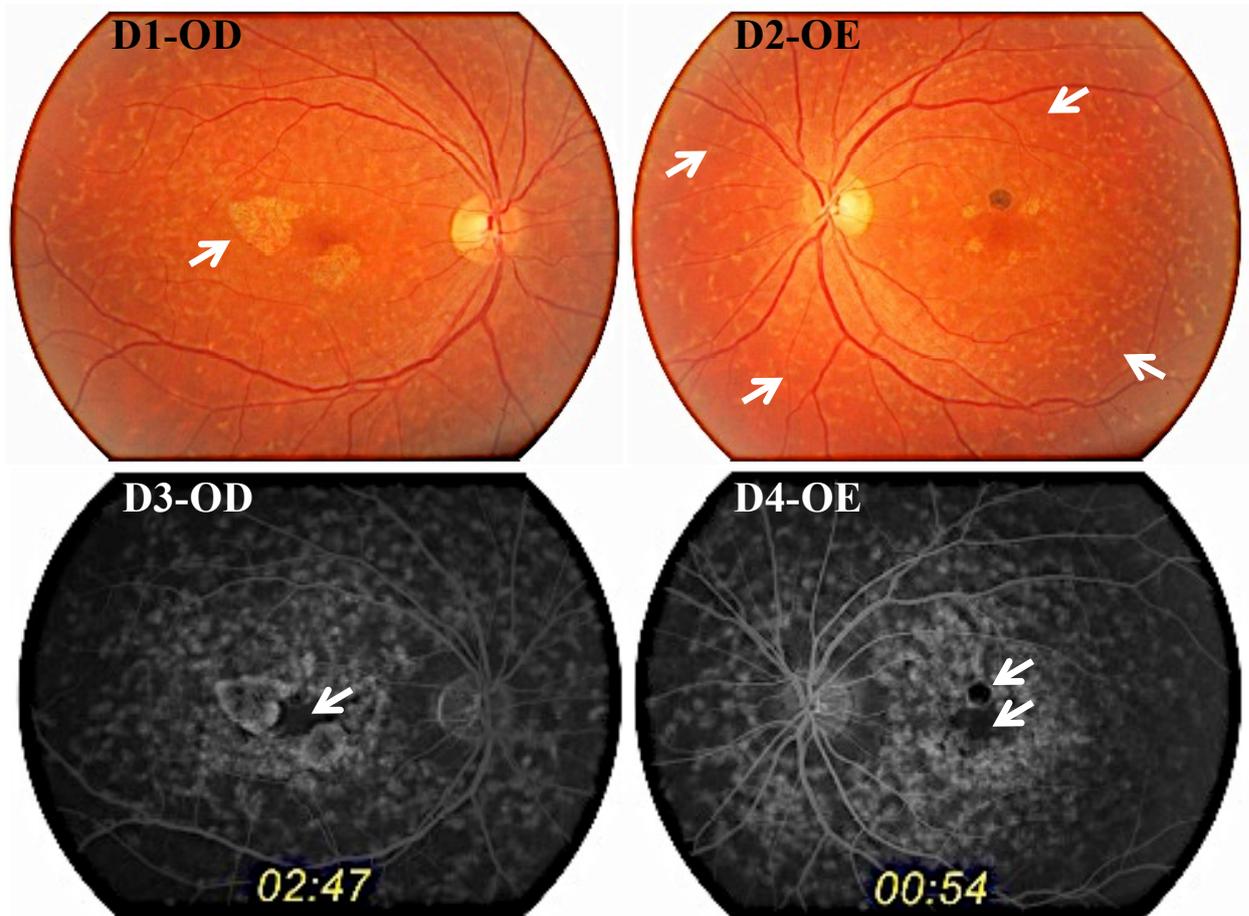


Figura 16 – Retinografias (D1 - D2) e angiografias (D3 - D4) dos olhos direito (OD) e esquerdo (OE) do sujeito STG06. As setas em D1 e D2 indicam severa degeneração evidenciada pelo aspecto de bronze batido cobrindo uma extensa área na retina. Sujeito apresentando o estágio III com grande área de hiperfluorescência das manchas floculares na área posterior e marcação da atrofia na região macular além do efeito hipofluorescente na coróide causado pela deposição degenerativa de lipofuscina no EPR.

### 5.3 TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA RETINIANA

As medidas de espessura da região macular de ambos os olhos foram determinadas em oito dos onze sujeitos amostrados, e em vinte e dois olhos utilizados como controles. Os valores encontrados correspondem a área circular de 1 mm de diâmetro no centro da mácula (Figura 16). Os valores médios e seus respectivos desvios padrão quando estimados separadamente produziram os seguintes resultados: nos sujeitos com maculopatia  $131,4 \pm 24,3 \mu\text{m}$  (OD) e  $127,4 \pm 23,9 \mu\text{m}$  (OE), e nos controles  $237,3 \pm 30,5 \mu\text{m}$  (OD) e  $236,5 \pm 29,7 \mu\text{m}$  (OE), sem significância estatística entre as diferenças encontradas dentro dos dois grupos ( $p=0,25$  e  $p=0,32$ ) (Tabela 3). A determinação das médias entre os dois olhos por sujeitos nos dois grupos permitiu a estimativa de variação para as espessuras maculares com os valores em  $102,5 \mu\text{m}$  (STG05) e  $167,5 \mu\text{m}$  (STG07) no grupo de sujeitos com a maculopatia e  $188,5 \mu\text{m}$  (CTRL06) e  $294 \mu\text{m}$  (CTRL001) naqueles do grupo controle. Além disso quando testadas as diferenças observadas entre estes valores médios demonstraram haver associação entre a diminuição da espessura da região macular e a manifestação da maculopatia de Stargardt ( $p=0,0001$ ).

Sujeito	Espessura macular			Controle	Espessura macular		
	OD	OE	média		OD	OE	média
STG01	133	105	119	CTRL01	293	295	294
STG02	137	124	130,5	CTRL02	257	260	258,5
STG03	134	125	129,5	CTRL03	217	212	214,5
STG04	ND	ND	ND	CTRL04	229	231	230
STG05	104	101	102,5	CTRL05	232	222	227
STG06	113	110	111,5	CTRL06	185	192	188,5
STG07	167	168	167,5	CTRL07	254	252	253
STG08	161	156	158	CTRL08	196	199	197,5
STG09	102	130	116	CTRL09	240	242	241
STG010	ND	ND	ND	CTRL10	257	254	255,5
STG011	ND	ND	ND	CTRL011	250	243	246,5
Média	131,4	127,4			237,3	236,5	
DP	24,3	23,9			30,5	29,7	
Teste <i>t</i>	p=0,25				p=0,32		

Tabela 3 – Medidas de espessura macular em micrômetros obtidas nos grupos investigados (ND – não disponível).

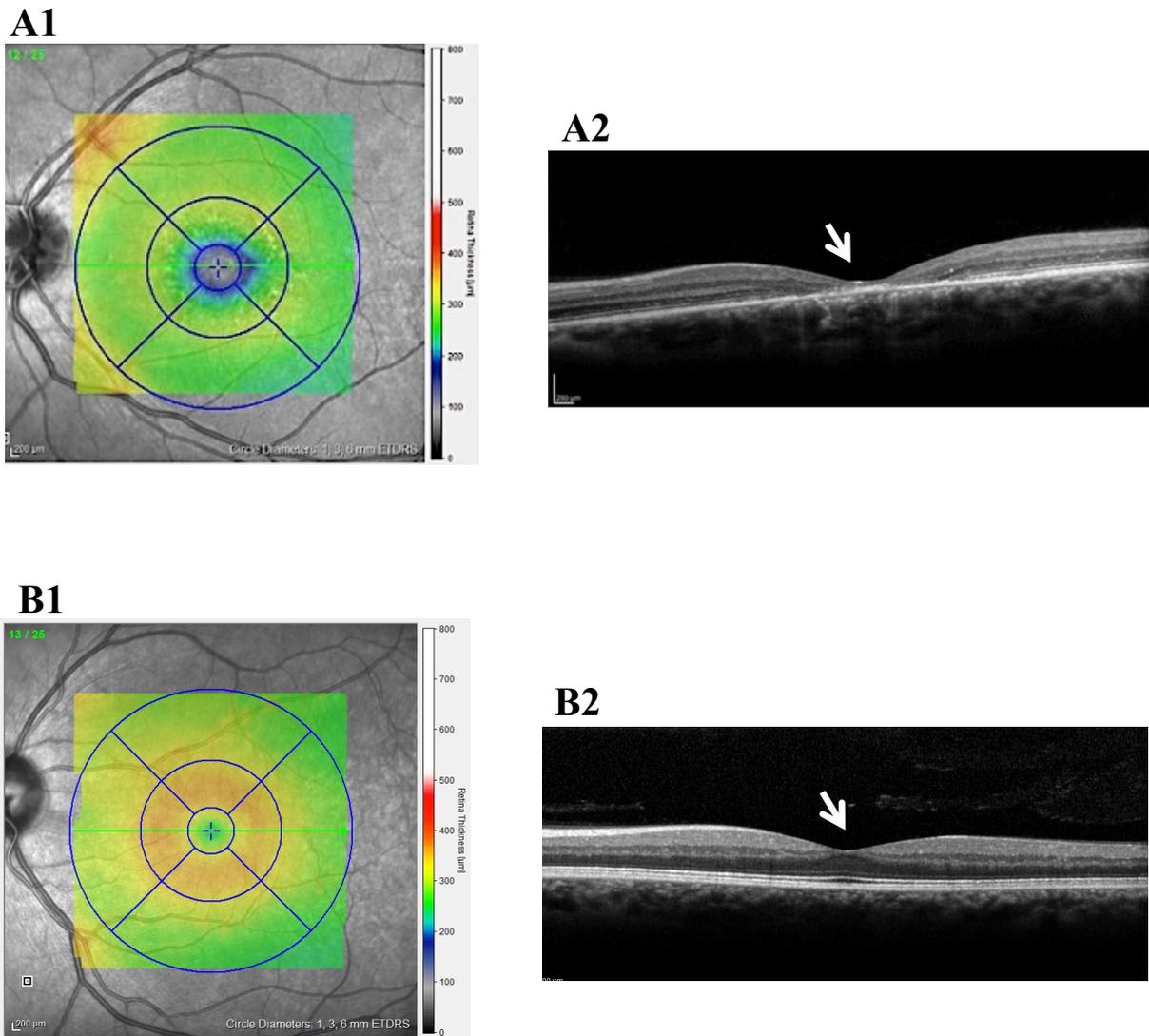


Figura 17 – Imagens obtidas na tomografia de coerência óptica retiniana. A1: áreas circulares utilizadas na estimativa de espessura da retina central. Nesta tese a medida obtida no círculo mais interno, de 1 mm de diâmetro, foi utilizada como espessura macular. A2: seção transversal gerada pela varredura do TCOR demonstrando a mácula do sujeito STG02 com 124  $\mu\text{m}$ . Em B1 e B2 são apresentadas as imagens do sujeito controle CTRL01 com 295  $\mu\text{m}$  de espessura. É possível observar as diferenças de espessura das regiões maculares indicadas pela setas.

#### 5.4 A AMPLITUDE DO ELETORRETINOGRAMA DE CAMPO TOTAL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO AO CLARO: SUJEITOS CONTROLE

A Figura 18 mostra os registros médios do grupo controle em 5 diferentes momentos da adaptação ao claro: no início, em 1, 5, 10, 15 e 20 minutos. A forma de onda do eletrorretinograma mostrou a presença das ondas a e b desde o princípio até o fim da adaptação ao claro. Qualitativamente é possível observar que há mudança especialmente da amplitude do eletrorretinograma de campo total, o qual aumentou ao longo da adaptação ao claro.

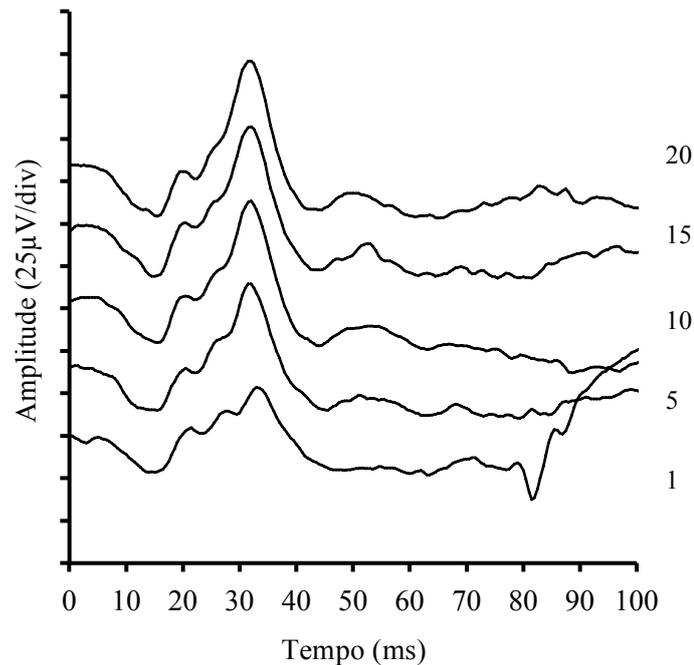


Figura 18 - Forma de onda média do eletrorretinograma de campo total do grupo controle. Os registros mostram o início da adaptação ao claro e depois de 5, 10, 15 e 20 minutos do início da adaptação. Foi possível observar as ondas a e b da resposta eletrorretinográfica.

A amplitude da onda b do eletrorretinograma de campo total dos sujeitos controles apresentou aumento ao longo da adaptação ao claro. Todos os sujeitos controle apresentaram este achado em maior ou menor grau. A Figura 19 mostra a variação da amplitude média do grupo controle a cada 10 s ao longo dos 20 minutos de adaptação ao claro. Há claramente um aumento não linear desta amplitude do eletrorretinograma em função

do tempo de adaptação ao claro. Inicialmente houve um rápido aumento da amplitude e posteriormente a amplitude estabilizou até completar o tempo de adaptação ao claro.

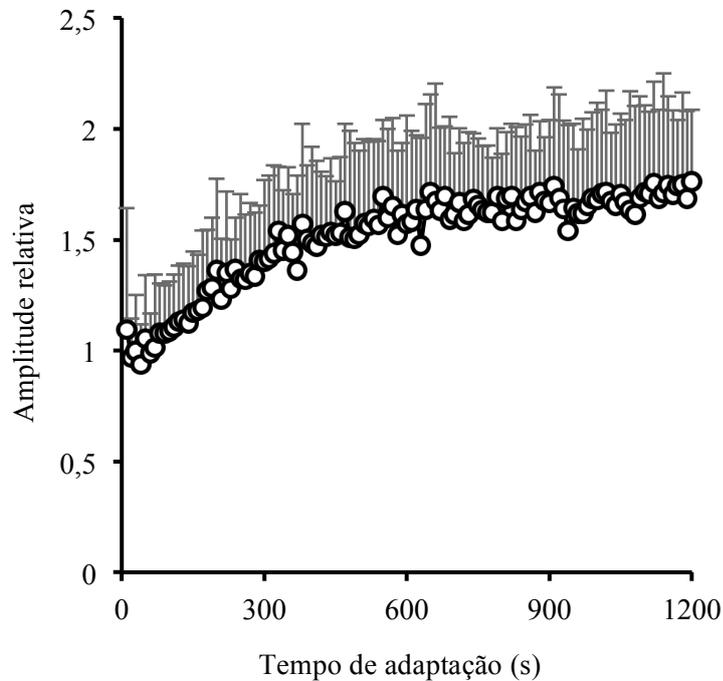


Figura 19 - Amplitude média da onda b do eletrorretinograma de campo total do grupo controle. Os registros foram obtidos em função do tempo de adaptação ao claro. Houve um aumento não linear da amplitude do eletrorretinograma ao longo da adaptação ao claro. As barras representam o desvio padrão.

Em cada sujeito controle foi ajustada uma função hiperbólica para modelar esta variação de amplitude do eletrorretinograma em função do tempo de adaptação ao claro.

A Figura 20 mostra o intervalo entre os percentis 5% e 95% desta função. A partir deste ajuste ao modelo não linear foi estimada a constante de tempo ( $T_{50}$ ), o valor de amplitude máxima da função ( $A_{máx}$ ) e o ganho da função ( $G$ ). A Tabela 4 mostra os valores médios e os intervalos entre os percentis 5%-95% dos parâmetros estimados do modelo.

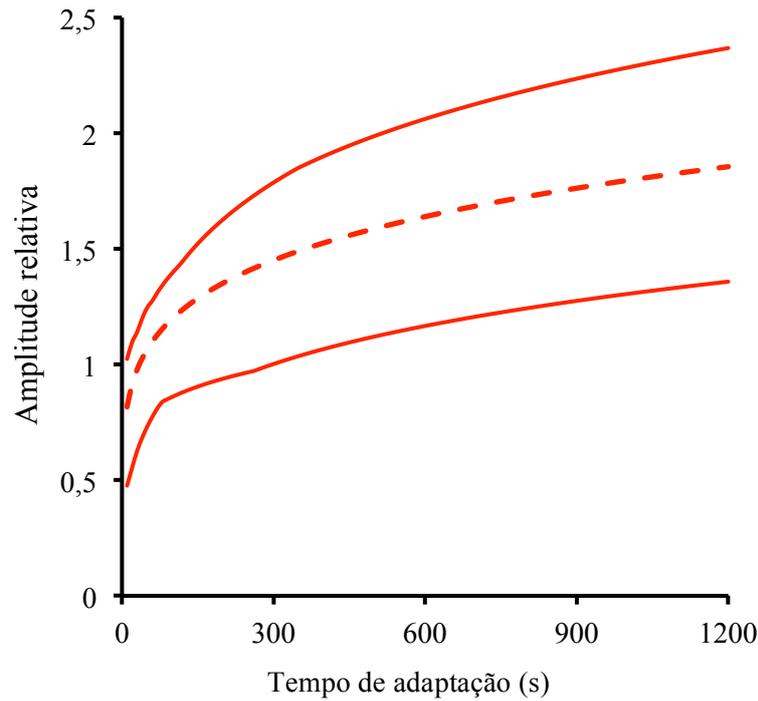


Figura 20 - Intervalo entre os percentis 5% e 95% da função de amplitude do eletrorretinograma em função do tempo de adaptação ao claro. Este intervalo foi considerado como faixa de normalidade para comparar com os resultados dos pacientes de Stargardt. Linhas contínuas superior e inferior: percentis 95% e 5%, respectivamente. Linha tracejada: função média.

	Parâmetros		
	T50	Amáx	G
Percentil 95%	294,9	2,33	0,0087
Percentil 5%	154,09	1,37	0,0045
Média	208,19	1,83	0,0068
Desvio padrão	48,72	0,29	0,001

Tabela 4 - Parâmetros estimados das funções de variação da amplitude do eletrorretinograma de campo total ao longo da adaptação ao claro: estatística descritiva do grupo controle (T50, constante de tempo; Amáx, amplitude máxima do modelo; G, ganho da função).

### 5.5 A AMPLITUDE DO ELETRORRETINOGRAMA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADAPTAÇÃO AO CLARO: PACIENTES COM STARGARDT

A Figura 21 mostra os registros eletrorretinográficos dos pacientes de Stargardt. Um paciente apresentou ausência de resposta eletrorretinográfica desde o início da adaptação ao claro (STG09, em ambos os olhos). Alguns pacientes mostraram respostas com pouca definição dos componentes do eletrorretinograma no início da adaptação ao claro com posterior definição das respostas eletrorretinográficas (por exemplo, STG02 OD). Enquanto outros pacientes apresentaram respostas bem definidas no início da adaptação ao claro e que apenas aumentaram de amplitude ao longo da adaptação (por exemplo, STG01 OD).

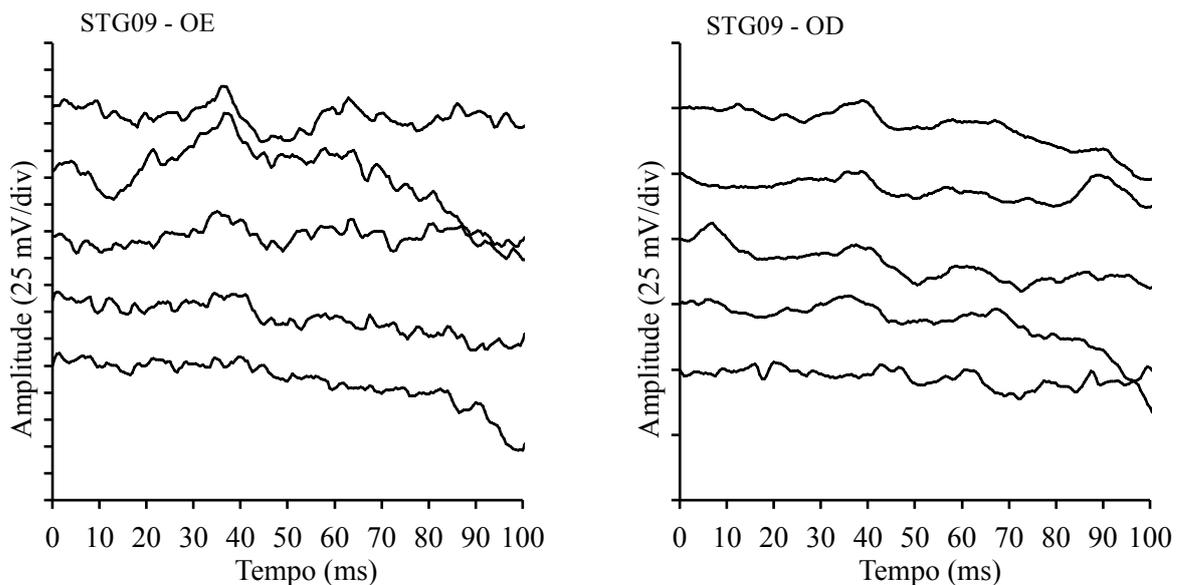


Figura 21 - Forma de onda do eletrorretinograma de campo total dos pacientes com doença de Stargardt. Os registros foram obtidos nos momentos de 1, 5, 10, 15 e 20 minutos depois do início da adaptação ao claro. Paciente STG09 que apresentou a maior deterioração na função visual detectada.

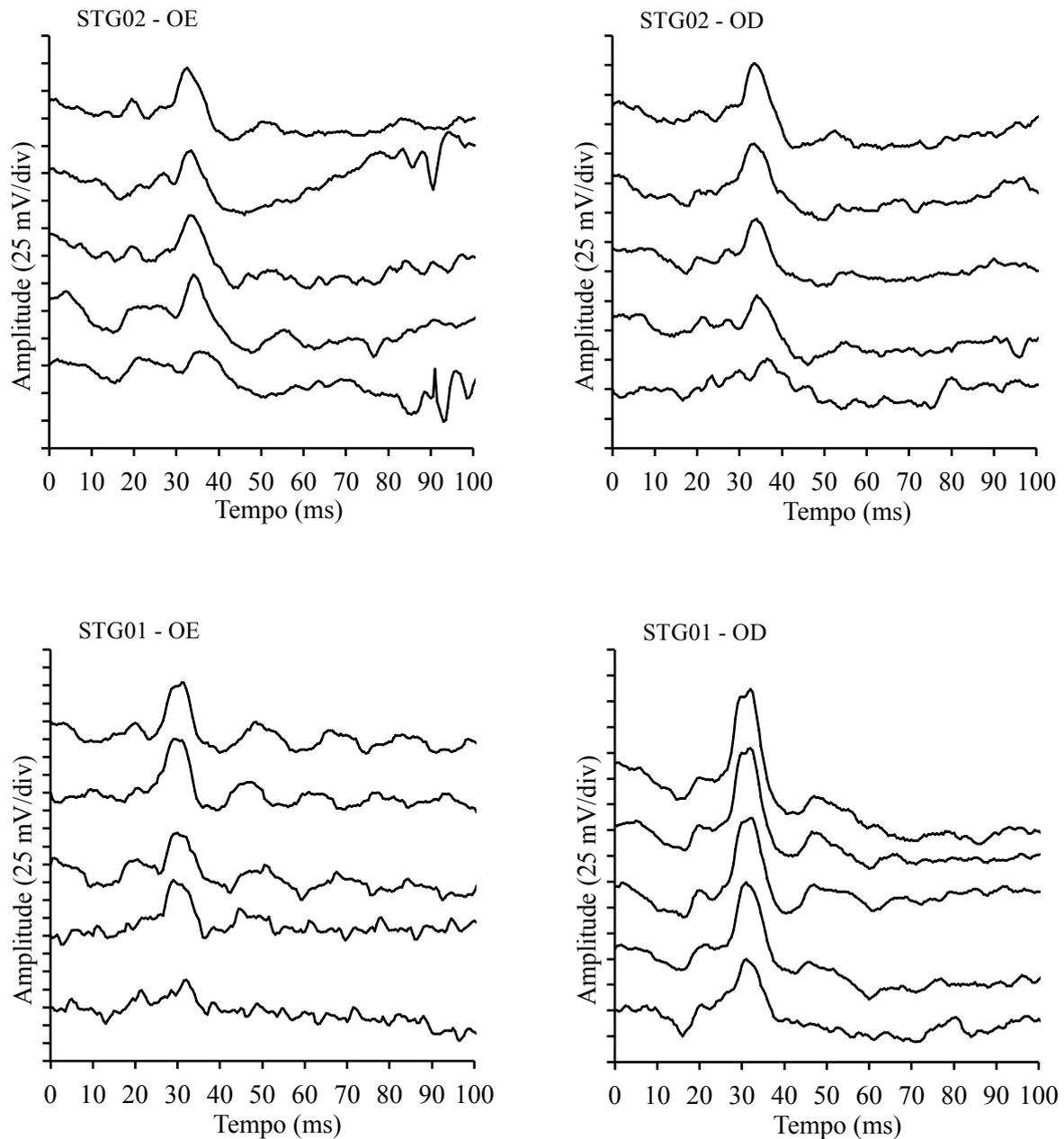


Figura 21 - Formas de onda do eletrorretinograma de campo total dos pacientes STG02 e STG01 com a maculopatia de Stargardt. Os registros foram obtidos nos momentos de 1, 5, 10, 15 e 20 minutos depois do início da adaptação ao claro (cont.).

As funções que melhor se ajustaram aos valores de amplitude do eletrorretinograma dos pacientes com doença de Stargardt em função da duração da adaptação ao claro são mostrados na Figura 22. As funções de cada olho dos pacientes são comparadas com o intervalo interpercentis de 5-95% para o mesmo tipo de função dos sujeitos controle.

Dois pacientes (STG07 e STG09) apresentaram funções que não se encontravam dentro da faixa de normalidade do controle (Figura 23).

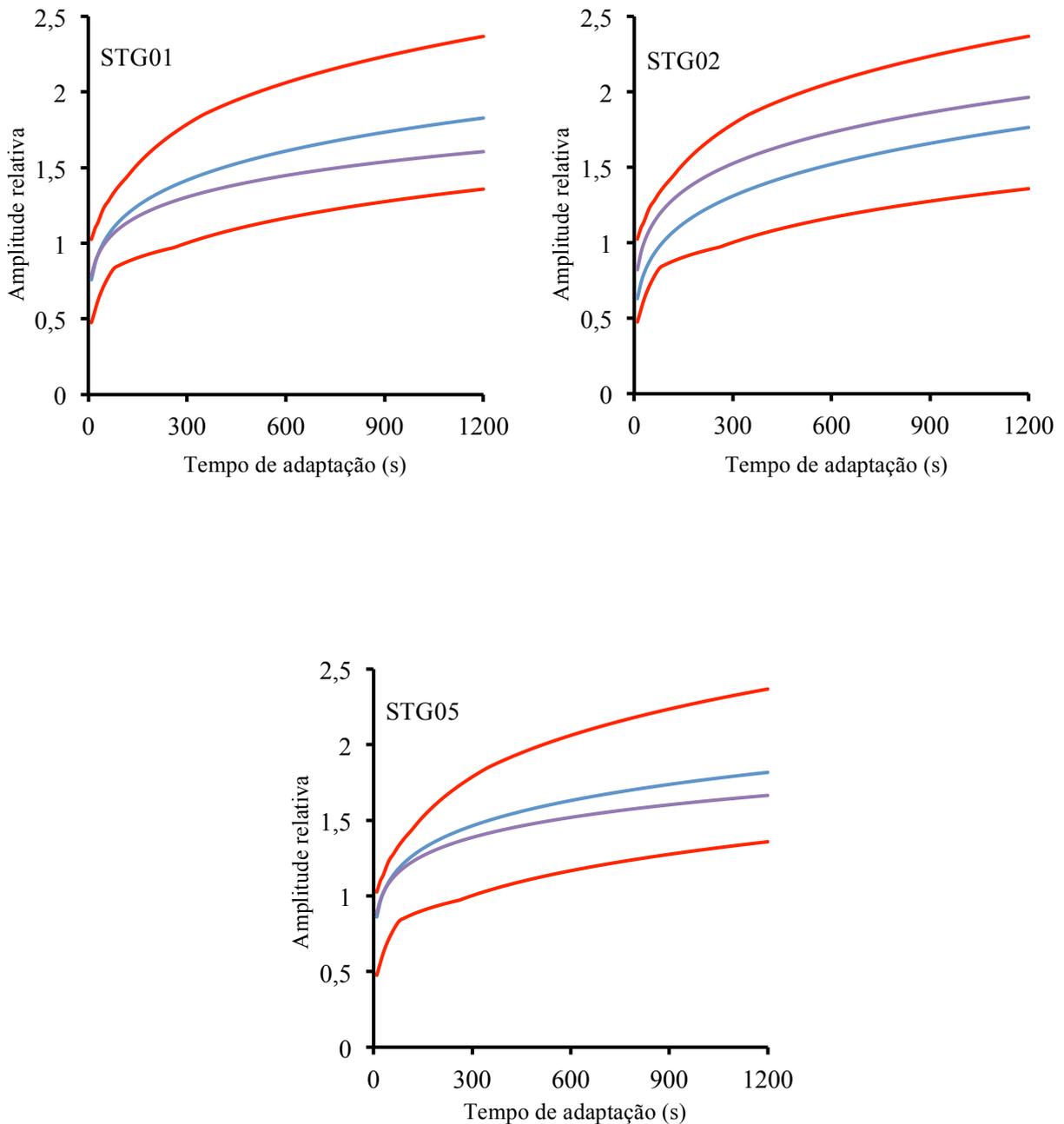


Figura 22 - Comparação das melhores funções ajustadas aos valores de amplitude da onda b dos pacientes de Stargardt. Os ajustes foram feitos em função do tempo de adaptação ao claro e comparados com os limites de normalidade do grupo controle (linhas vermelhas). Olho direito, linha azul; Olho esquerdo, linha violeta.

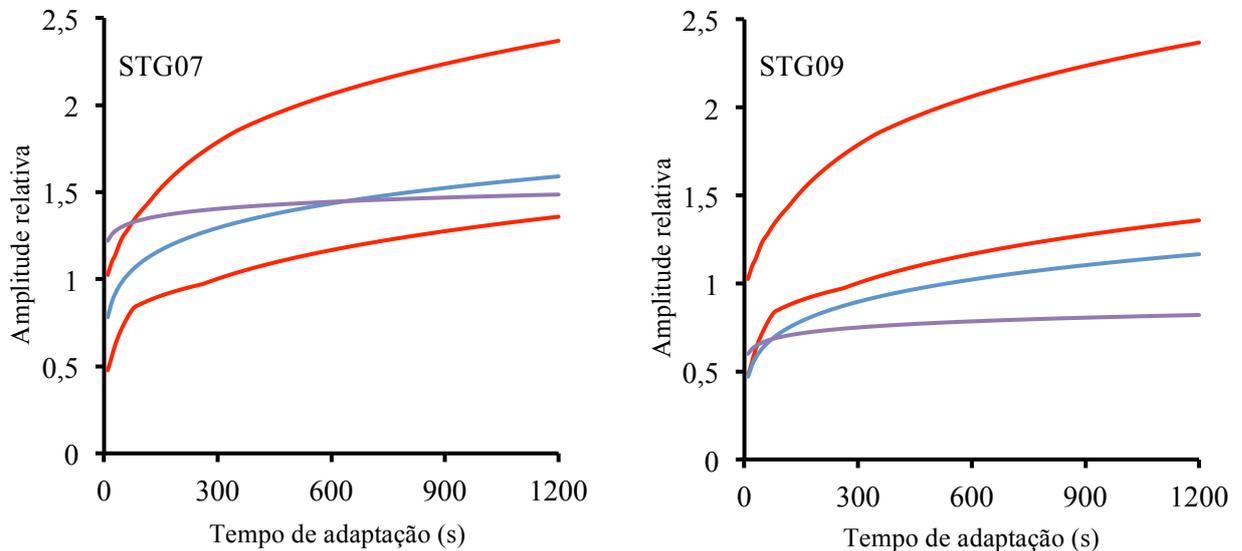


Figura 23 – Padrões obtidos para os pacientes fora das curvas de normalidade. Os dois pacientes STG07 e STG09 cujas análises demonstram funções fora da área de normalidade obtida para o grupo controle (linhas vermelhas). Olho direito, linha azul; Olho esquerdo, linha violeta.

A Tabela 5 a seguir mostra os valores individuais dos pacientes para os parâmetros de T50, Amáx e G comparados com os valores de normalidade do grupo controle. Nove dos 10 olhos avaliados com a doença de Stargardt, apresentaram valores dos parâmetros de avaliação da adaptação ao claro no intervalo abaixo do primeiro quartil da distribuição do grupo controle. Essa localização preferencial dos pacientes na faixa com valores mais baixos da distribuição do grupo controle, pode ser um indicador de tendência a disfunção eletrorretinográfica.

Tabela 5 com os parâmetros estimados das funções de variação da amplitude do eletrorretinograma de campo total ao longo da adaptação ao claro.

	Parâmetros		
	T50	Amáx	G
Limite superior de normalidade	294,9	2,33	0,0087
Limite inferior de normalidade	154,09	1,37	0,0045
Primeiro quartil do controle	181,84	1,71	0,0059
stg01 OE	159,71	1,81	0,0079
stg01 OD	233,67	1,61	0,0053
stg02 OE	228,09	1,75	0,0054
stg02 OD	199,19	1,95	0,0071
stg05 OE	252,46	1,83	0,0056
stg05 OD	244,42	1,67	0,0055
stg07 OE	120,79	1,48	0,0093
stg07 OD	103,66	1,46	0,0129
stg09 OE	133,34	1,07	0,0057
stg09 OD	109,51	0,79	0,0064

Tabela 5 - T50, constante de tempo; Amáx, amplitude máxima do modelo; G, ganho da função; OD, olho direito; OE, olho esquerdo. Os valores destacados estão todos abaixo do primeiro quartil do controle.

## 5.6 GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO NO GENE ABCA4

As sequências nucleotídicas completas dos 50 éxons do gene ABCA4 foram determinadas nos onze indivíduos portadores da maculopatia de Stargardt amostrados. No total foram identificadas quatro variantes do tipo não-sinônimas e três do tipo sinônimas dentre os éxons analisados descritas na Tabela 4.

Sujeito	Exon	Alteração nucleotídica	Alteração peptídica	Tipo	Referência
STG01	28	4184T>C	L1395P	homozigoto	rs1047379
	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
	41	5814A>G	L1938L	heterozigoto	----
	46	6285T>C	D2095D	homozigoto	----
STG02	28	4184T>C	L1395P	homozigoto	rs1047379
	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
	41	5814A>G	L1938L	heterozigoto	----
	46	6285T>C	D2095D	homozigoto	----
STG03	28	4184T>C	L1395P	homozigoto	rs1047379
	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
STG04	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
	41	5814A>G	L1938L	heterozigoto	----
STG05	28	4184T>C	L1395P	homozigoto	rs1047379
	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
	44	6069C>T	I2023I	heterozigoto	----
STG06	28	4184T>C	L1395P	homozigoto	rs1047379
	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
	44	6069C>T	I2023I	homozigoto	----
	46	6285T>C	D2095D	homozigoto	----
STG07	28	4184T>C	L1395P	homozigoto	rs1047379
	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
STG08	28	4184T>C	L1395P	homozigoto	rs1047379
	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
	46	6285T>C	D2095D	homozigoto	----
STG09	38	5451T>G	D1817E	homozigoto	rs1129480
	44	6069C>T	I2023I	heterozigoto	----
STG010	10	1335C>G	S445R	homozigoto	rs61748552
	44	6069C>T	I2023I	heterozigoto	----
STG011	12	1622T>C	L541P	homozigoto	rs61751392

Tabela 6 – Mutações identificadas nos sujeitos Stargardt investigados neste trabalho. Os indicadores das referências estão disponíveis na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov/SNP>). L = leucina, P = prolina, D = ácido aspártico, E=ácido glutâmico, I=isoleucina, S=serina, R=arginina.

Deste total duas mutações foram encontradas com elevada frequência no grupo de sujeitos em estudo: a mutação do tipo transversão 5451T>G localizada no éxon 38 que provoca a mudança do aminoácido de posição 1817 de ácido aspártico para ácido glutâmico (Asp1817Glu), foi identificada em nove pacientes; em outros sete sujeitos, o éxon 28 continha no nucleotídeo 4184 a transição T>C cujo códon codifica o aminoácido prolina na posição 1395 da proteína ABCA4 ao invés do tipo selvagem o peptídeo leucina (Pro1395Leu). Todos estes alelos apresentaram-se na forma homozigótica nos amplicons sequenciados.

Foram também observadas duas outras transversões: na posição 1335 (C>G) do éxon 10, havendo troca de uma serina por uma arginina no peptídeo de número 455 e; no éxon 13 do nucleotídeo T para A, alterando o aminoácido fenilalanina para tirosina na posição 608 do polipeptídeo codificado.

Em sete dos onze sujeitos analisados foram detectadas formas alélicas consideradas complexas (denominados heterozigotos compostos), ou seja, verificou-se a presença de duas variantes não sinônimas no mesmo cromossomo.

As demais variações presentes nos éxons 41 (5814A>G; Leu1938Leu), 44 (6069C>T; Ile2023Ile) e 46 (6285T>C; Asp2095Asp) foram identificadas como do tipo sinônimas ou silenciosas pois não provocam alterações nas trincas de nucleotídeos que ocasionem trocas dos tipos de aminoácidos codificados. Entre as formas alélicas silenciosas somente aquelas do éxon 46 eram homozigóticas, as do éxon 41 heterozigóticas e, no éxon 44 ambas as formas foram encontradas.

Não foram detectadas novas variantes alélicas nos fragmentos dos éxons que foram amplificados para o sequenciamento realizado. Portanto, todas estas variações nucleotídicas já haviam sido previamente descritas e confirmadas através das análises comparativas realizadas com as bases de dados descritas na metodologia deste estudo.

## 5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DO ABCA4

Os valores de expressão relativos ao gene ABCA4 foram determinados em sete do total de onze pacientes participantes do estudo e, para efeito de comparação, em treze sujeitos utilizados como controles. Nas mesmas condições foram estimados os valores de expressão do gene de referência ALB. Na Figura 16 são mostradas as curvas de amplificação obtidas durante as reações de amplificação dos genes ABCA4 e ABL nos grupos caso e controle.

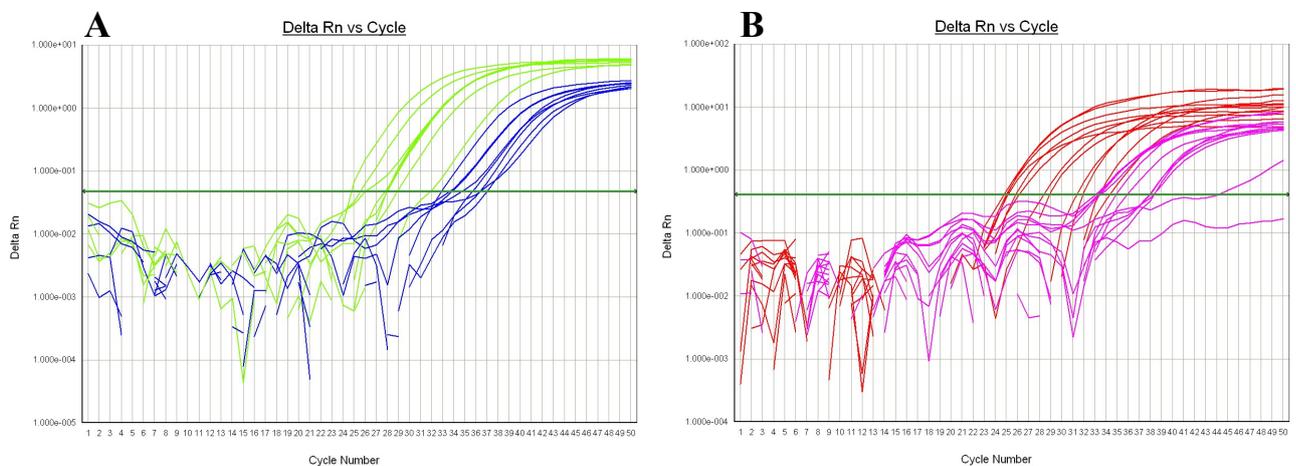


Figura 24 – Curvas de amplificação para o rt-qPCR. No grupo caso em A o gene ABL é indicado pelas linhas verdes e o ABCA4 nas linhas azuis; Em B no grupo controle as linhas laranjas representam o gene ABL e as de cor rosa o ABCA4. Linha verde horizontal indica o ciclo limiar de detecção (Ct).

Os diagramas acima representam o que se observou ao final das reações de amplificação para a detecção dos genes ABCA4 e ABL. As linhas coloridas indicam o aumento exponencial nas quantidades dos fragmentos dos genes em estudo a partir do ponto limiar indicado pela linha verde na horizontal. Ao término destas reações foram gerados os valores que representavam os ciclos de detecção (Ct) dos fragmentos gênicos para cada uma das amostras. A partir destes valores foram calculadas as médias de Ct de 34,32 e 24,27 no grupo de pacientes e, 35,21 e 28,31 no grupo controle, para os genes ABCA4 e ABL

respectivamente, como indicado na Tabela 6. Em seguida foram determinados os valores médios de expressão do gene ABCA4 relativos ao gene controle ABL no grupo de sujeitos portadores da maculopatia de Stargardt com média e desvio padrão de  $0,005192368 \pm 0,003645592$ , e  $0,088893347 \pm 0,152379593$  no grupo controle. A partir destes dados utilizou-se o teste *U* (Mann-Whitney) para a avaliação de significância entre as diferenças observadas. Com a obtenção de um valor de  $p=0,0002$ , rejeitou-se a hipótese de que as variações nos níveis de expressão do ABCA4 são casuais. Os valores apurados demonstram a ocorrência de um diferença quantitativa nos níveis de expressão, na média, de dezessete vezes menor do gene ABCA4 nos sujeitos portadores da retinopatia de Stargardt em comparação àqueles do grupo controle (Figura 17).

Sujeitos	Ct ABCA4	Ct ABL	$2^{-\Delta Ct}$	Controles	Ct ABCA4	Ct ABL	$2^{-\Delta Ct}$
STG01	34,73	23,93	0,002243551	CTRL01	36,93	30,86	0,059539875
				CTRL02	34,62	31,77	0,554784736
STG05	34,3	23,73	0,002631316	CTRL03	37,95	29,92	0,015303442
				CTRL04	33,95	26,27	0,019505165
STG06	33,82	24,8	0,002649618	CTRL05	33,83	26,09	0,018710605
				CTRL06	33,09	25,78	0,025207555
STG07	32,48	24,13	0,007704943	CTRL07	33,55	28,18	0,096722812
				CTRL08	33,52	25,23	0,012779720
STG09	35,06	24,5	0,004978752	CTRL09	34,78	29,58	0,108818820
				CTRL10	35,47	27,58	0,016862941
STG08	34,19	24,54	0,012259127	CTRL11	38,30	34,09	0,216134308
				CTRL12	35,63	25,53	0,003644660
STG010	35,66	25,65	0,003879268	CTRL13	36,16	27,12	0,007598867
Média	34,32	24,47	0,005192368		35,21	28,31	0,088893347
DP			0,003645592				0,152379593
Diferença de expressão			17,12				

Tabela 7 – Valores calculados representando os níveis de expressão gênica para os grupos investigados.

A Figura 23 ilustra no gráfico da esquerda as diferenças obtidas a partir das médias entre os valores de Ct determinados para os grupos investigados. Na mesma figura, a direita, tem-se a representação gráfica dos valores de Ct obtidos para cada um dos sujeitos amostrados nos dois grupos analisados. Observa-se que os sujeitos do grupo que possui a maculopatia de Stargardt estão abaixo daqueles do grupo controle. Os sujeitos controle 01, 09 e 011 não aparecem nesta plotagem por apresentarem valores e bem acima daqueles utilizados na escala do eixo y. O valor limite de 0,1 neste eixo foi utilizado por possibilitar uma melhor visualização das diferenças entre as amostras analisadas.

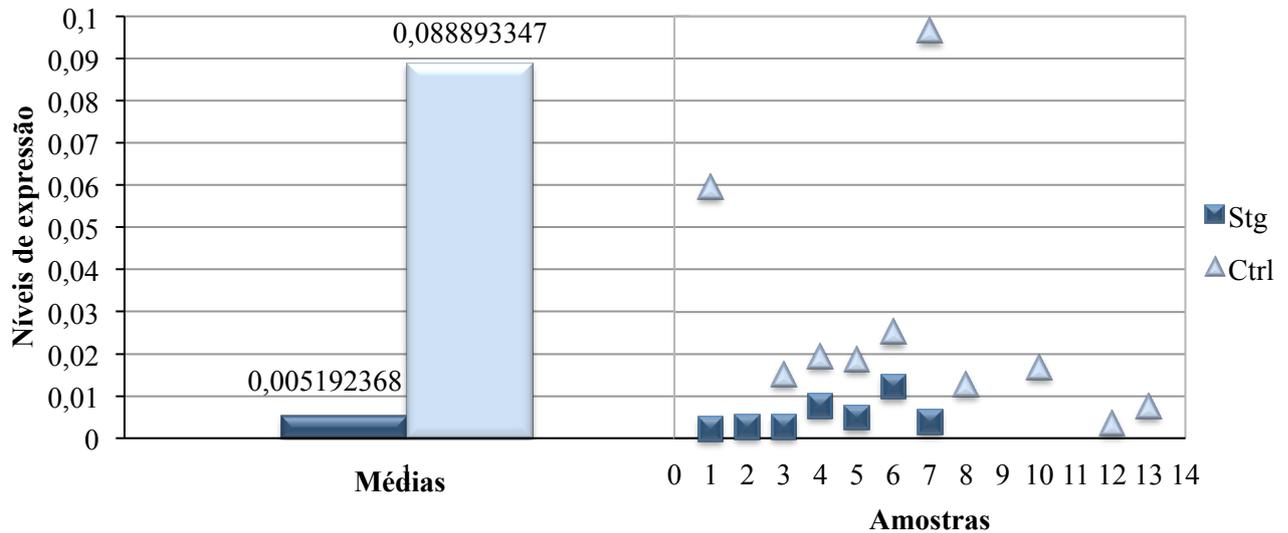


Figura 25 – Gráficos com os valores médios de expressão e demonstrativo global dos níveis de expressão dos genes ABCA4 e ABL nos pacientes e controles. A direita o histograma com os valores médios calculados para os grupos estudados. A esquerda um demonstrativo global dos níveis de expressão dos genes ABCA4 e ABL nos sujeitos Stargardt (Stg) e controle (Ctrl); nesta apresentação gráfica fica evidenciado o nível mais baixo de expressão gênica no grupo caso.

## 5.8 MORFOLOGIA DOS GRANULÓCITOS

Foram analisadas oito lâminas contendo esfregaço sanguíneo dos sujeitos Stargardt que fizeram parte deste estudo. Os granulócitos do tipo neutrófilos foram contados até o total de 100 eventos e classificados morfológicamente quanto ao padrão de lobularidade

apresentado. Da mesma maneira foram analisadas as células de quatorze sujeitos controle pertencentes a base de dados de referência em normalidade do Centro Hemoterápico do Pará (HEMOPA), de acordo com os valores descritos na Tabela 7.

Sujeitos	Bastão		2 lóbulos		3 lóbulos		4 lóbulos		5 lóbulos		6 ou mais lóbulos		Células totais
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n
STG01	17	17,00	12	12,00	37	37,00	25	25,00	9	9,00	0	0,00	100
STG02	10	10,10	13	13,13	42	42,42	28	28,28	5	5,05	3	3,03	99
STG05	13	12,87	15	14,85	45	44,55	25	24,75	7	6,93	1	0,99	101
STG06	19	18,27	20	19,23	39	37,50	22	21,15	2	1,92	2	1,92	104
STG07	16	16,00	18	18,00	40	40,00	15	15,00	7	7,00	4	4,00	100
STG08	26	25,49	13	12,75	39	38,24	19	18,63	5	4,90	0	0,00	102
STG09	12	12,00	12	12,00	52	52,00	22	22,00	2	2,00	0	0,00	100
STG011	15	15,00	19	19,00	43	43,00	17	17,00	4	4,00	2	2,00	100
<b>Média</b>	<b>16,00</b>		<b>15,25</b>		<b>42,13</b>		<b>21,63</b>		<b>5,13</b>		<b>1,5</b>		

Controles	Bastão		2 lóbulos		3 lóbulos		4 lóbulos		5 lóbulos		6 ou mais lóbulos		Células totais
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n
CTRL01	5	4,95	5	4,95	51	50,50	31	30,69	5	4,95	4	3,96	101
CTRL02	3	2,97	11	10,89	62	61,39	21	20,79	2	1,98	2	1,98	101
CTRL03	9	8,73	16	15,53	45	43,68	28	27,18	5	4,85	0	0,00	103
CTRL04	12	11,76	18	17,64	44	43,13	17	16,67	10	9,80	1	0,98	102
CTRL05	16	16,16	29	29,29	36	36,36	13	13,13	2	2,02	3	3,03	99
CTRL06	3	3,00	11	11,00	52	52,00	23	23,00	5	5,00	6	6,00	100
CTRL07	11	10,89	19	18,81	50	49,50	20	19,80	1	0,99	0	0,00	101
CTRL08	11	10,89	26	25,74	52	51,48	12	11,88	0	0	0	0,00	101
CTRL09	9	8,57	18	17,15	49	46,67	26	24,77	3	2,85	0	0,00	105
CTRL010	4	3,96	16	15,84	57	56,43	22	21,78	2	1,98	0	0,00	101
CTRL011	5	5,05	2	2,02	48	48,48	33	33,33	10	10,1	1	1,01	99
CTRL012	3	3,00	7	7,00	53	53,00	29	29,00	6	6,00	2	2,00	100
CTRL013	7	6,86	20	19,60	49	48,03	20	19,60	6	5,88	0	0,00	102
CTRL014	5	5,05	14	14,14	58	58,58	16	16,16	6	6,06	0	0,00	99
<b>Média</b>	<b>7,36</b>		<b>15,14</b>		<b>50,43</b>		<b>22,21</b>		<b>4,5</b>		<b>1,36</b>		

Tabela 8 – Totais de neutrófilos quanto aos morfotipos identificados por microscopia óptica. As médias aqui mostradas são referentes aos valores absolutos determinados para os totais de células encontradas, não estão dispostos os valores médios dos percentuais calculados.

Em geral não houve diferenças estatisticamente significantes para as quantidades de células que foram contadas quanto aos padrões de lobularidade identificados.

Contudo, as análises demonstraram haver uma variação na lobularidade dos neutrófilos bastonados e dos segmentados com três lóbulos, com médias de  $(16,00 \pm 4,96$  e  $42,13 \pm 4,73)$  para pacientes e  $(7,36 \pm 4,05$  e  $50,43 \pm 6,42)$  para os controles, respectivamente. Estes valores demonstram a ocorrência nos bastões de um aumento de duas vezes da lobularidade em pacientes com relação ao grupo controle ( $p=0,0005$ ) e, uma diminuição de 0,8 vezes ( $p=0,0043$ ) para os morfotipos trilobulados obtidos e comparados no grupo de sujeitos afetados pela maculopatias de Stargardt. Na Figura 18 estão dispostas as quantidades médias e os respectivos desvios para os totais de neutrófilos segundo a morfologia apresentada.

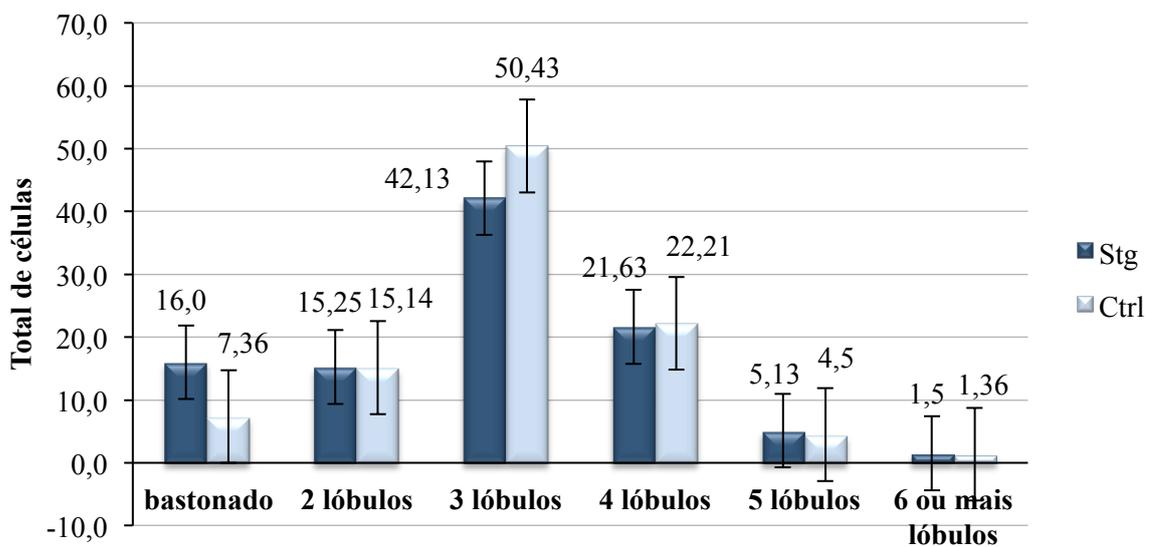


Figura 26 – Valores médios do número de neutrófilos em relação aos morfotipos encontrados nos esfregaços sanguíneos.

A Figura 19 apresenta fotografias obtidas em microscópio óptico que ilustram os seis tipos distintos de neutrófilos maduros encontrados, conforme o aspecto grumoso de sua cromatina e quantidade de lóbulos distintos conectados por estreitos filamentos de heterocromatina densa, limitados por membrana nuclear. Estes morfotipos maduros foram identificados também pelo diâmetro medido entre 12 a 15  $\mu\text{m}$ . São notados os grânulos citoplasmáticos espalhados uniformemente pelo citoplasma.

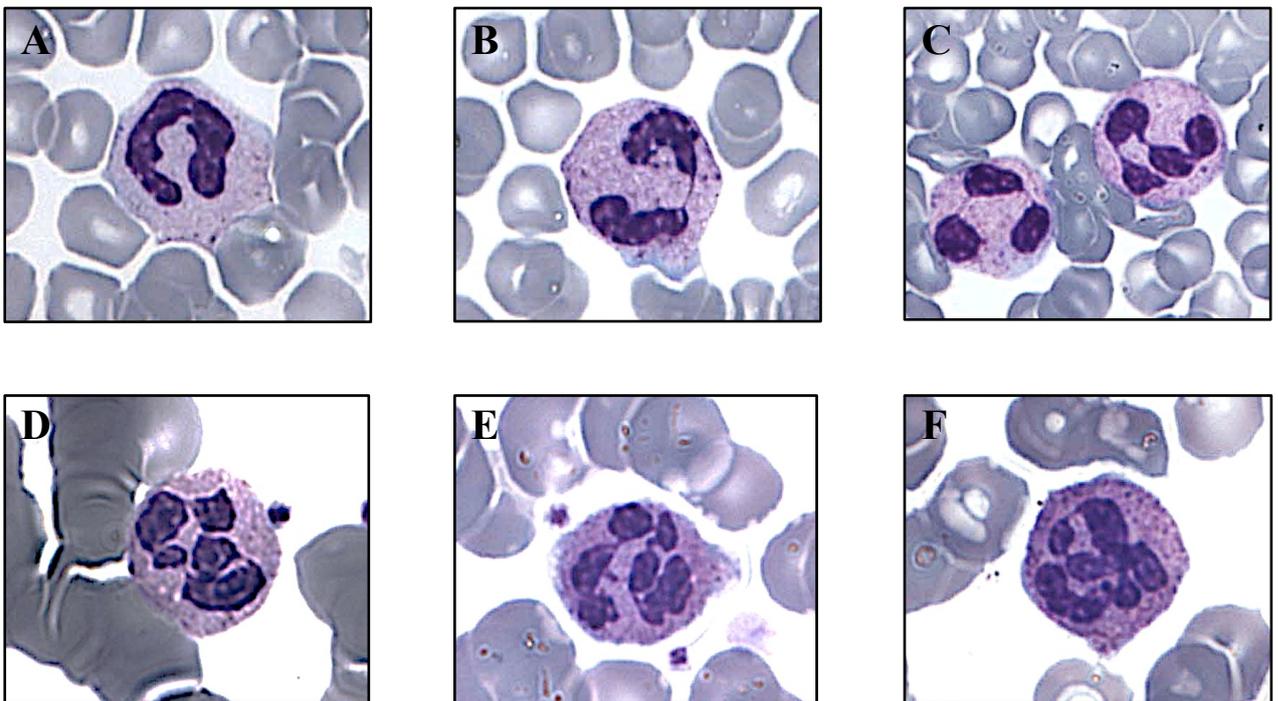


Figura 27 – Imagens obtidas em microscopia óptica com resolução de 3000 X. Em A um neutrófilo bastonado, reconhecido pela ausência de lóbulos nucleares; de B até F observa-se neutrófilos segmentados pois há lóbulos unidos por um filamento cuja largura equivale a menos de um terço do diâmetro dos lóbulos (AKENZUA et al., 1974), ou ainda, por estarem os lóbulos unidos por um filamento nuclear claramente definido (CHRISTENSEN et al., 1981); em B temos um granulócito bi-lobulado, em C tri e tetra-lobulados, em D penta-lobulado, e E e F exemplos de neutrófilos hexalobulados.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 O ELETORRETINOGRAMA AO LONGO DA ADAPTAÇÃO AO CLARO COMO MÉTODO INVESTIGATIVO DA FUNÇÃO VISUAL EM PACIENTES COM DOENÇA DE STARGARDT

As mudanças do eletrorretinograma em função da duração da adaptação ao claro têm sido documentadas em sujeitos saudáveis e é caracterizada por um aumento de amplitude e diminuição do tempo implícito quanto maior é o tempo de adaptação ao claro (GOURAS; MCKAY, 1989). A origem deste fenômeno não foi totalmente elucidada, mas sugere-se que modificações no estado elétrico dos fotorreceptores ou interações entre cones e bastonetes contribuam para o aumento da amplitude do eletrorretinograma de campo total em função do tempo de adaptação ao claro (ARMINGTON; BIERSDORF, 1958; GOURAS; MACKAY, 1989).

Este fenômeno tem sido descrito em diferentes modalidades de eletrorretinografia como o eletrorretinograma de campo total (GOURAS; MACKAY, 1989; PEACHEY et al., 1989; MURAYAMA; SIEVING, 1992; BENOIT; LACHAPELLE, 1995), eletrorretinograma para estimulação de *flicker* (PEACHEY et al., 1992a, PEACHEY et al., 1992b; MACANANY; NOLAN, 2014), eletrorretinograma focal (WEINER; SANDENBERG, 1991) e eletrorretinograma multifocal (KONDO et al., 1999). Este protocolo de teste foi aplicado anteriormente em algumas doenças que acometem os fotorreceptores, como a retinose pigmentar (MILLER; SANDBERG, 1991; YAMAMOTO et al., 2000). Miller e Sandberg (1991) utilizaram estimulação com *flicker* de 30 Hz e observaram em um grupo de 33 pacientes que a maioria deles mostravam o aumento da amplitude e que a amplitude aproximava-se ou chegava às maiores amplitudes no final de um tempo de adaptação ao claro de 8 minutos. Além disso, o estudo deles mostrou que os pacientes que tinham linha de base menores tendiam a mostrar maiores e mais rápidos aumentos da amplitude relativa do que aqueles pacientes que tinham linha de base maiores, os quais

tinham variação de amplitude ao longo da adaptação ao claro semelhante ao grupo controle. Os autores concluíram que o uso do protocolo de registro do eletrorretinograma em função da duração da adaptação ao claro poderia ser um bom indicador do mal funcionamento da atividade fotorreceptora em retinose pigmentar. No entanto, Yamamoto et al. (2000) estudaram as variações de amplitude do eletrorretinograma em função do tempo de adaptação ao claro em 51 pacientes com retinose pigmentar. Eles também utilizaram um estímulo de campo total com *flicker* de 5 Hz. Eles não observaram diferenças entre as mudanças ocorridas no eletrorretinograma durante a adaptação ao claro dos pacientes com sujeitos controles.

A tese aqui apresentada descreve pela primeira vez este tipo de protocolo sendo aplicado em pacientes com doença de Stargardt. Apesar da doença de Stargardt acometer menor área retiniana que a retinose pigmentar foi levantada a hipótese que o mal funcionamento do trânsito dos fotorreceptores e o epitélio pigmentado poderia levar a alterações da adaptação ao claro nestes pacientes. Foi observado que pelo menos dois dos cinco pacientes (stg07 e stg09) testados apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. Os dois pacientes tiveram constante de adaptação menor que os demais pacientes e que o limite de normalidade do grupo controle. Além disso, o paciente stg09 apresentou menor amplitude máxima da função que os sujeitos controle e o paciente stg07 teve uma taxa de aumento de amplitude da função superior aos sujeitos controles. Também pudemos observar que a maioria dos pacientes apresentou parâmetros no primeiro quartil da distribuição dos parâmetros avaliativos da função de aumento de amplitude do eletrorretinograma em função da adaptação ao claro dos sujeitos controle.

Apesar da pequena quantidade de pacientes testados neste protocolo, considerou-se que a avaliação do eletrorretinograma em função do tempo de adaptação ao claro pode ser uma ferramenta promissora na avaliação de mal funcionamento dos fotorreceptores em sujeitos portadores da maculopatias de Stargardt, como já descrito anteriormente para a retinose pigmentar.

## 6.2 AS VARIANTES ALÉLICAS DETECTADAS

A epidemiologia molecular do gene ABCA4 em pacientes portadores da retinopatia recessiva de Stargardt de diferentes países tem revelado um número extraordinário de mutações (RAN et al., 2014). Até a conclusão desta tese, a sistematização dessas informações a partir das bases de dados disponíveis indicou a ocorrência de 536 mutações, na sua maioria compostas por polimorfismos de nucleotídeo único (pnu). O espectro mutacional do ABCA4 é bastante amplo incluindo mutações que ocasionam a troca do aminoácido a ser codificado, alteração ou parada no sentido de leitura dos códons, modificações das regiões para o processamento do RNA mensageiro, além ainda de deleções e inserções nucleotídicas. Porém, aproximadamente 70% das variações detectáveis são mutações pontuais não-sinônimas encontradas nos éxons do gene ABCA4 (Figura 19).

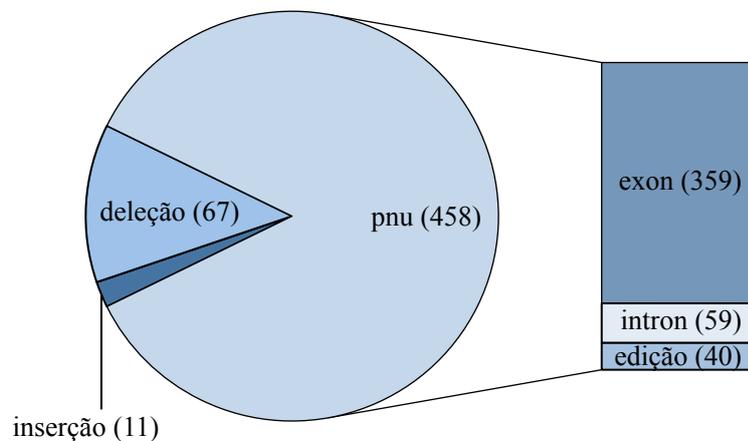


Figura 28 – Tipos de mutações encontradas ao longo do quadro de leitura aberta (ORF) do gene ABCA4. Em sua maioria as mutações de nucleotídeo único (pnu) ocorrem nos éxons do ABCA4, além daquelas encontradas nos íntrons e nas regiões que delimitam os locais de processamento (edição) entre éxons e íntrons para a formação do RNA mensageiro. Para esta compilação foram utilizadas as informações disponíveis nas bases de dados Retina International, ABC mutation database, RetinoGenetics, NCBI e HGMD. Não fizeram parte desta contagem as mutações presentes na região de controle da expressão do gene ABCA4. Os números entre parênteses representam o total de mutações identificadas.

Apesar dessa quantidade, os alelos mutantes mais frequentes não são prevalentes em mais do que 10% dos pacientes investigados. Fazem parte desta relação as variantes G1961E, G863A/delG863 e A1038V, encontradas na sua maioria entre indivíduos de descendência europeia e, em alguns casos restritas a grupos étnicos e geograficamente localizados, caracterizando o efeito fundador como nas populações do norte da Europa (G863A/delG863; MAUGERI et al., 2002), na Alemanha (L541P, A1038V; RIVERA et al., 2000), na Espanha (R1129L; VALVERDE et al., 2006), na Hungria (L541P/A1038V; HARGITAI et al., 2005), na África do Sul (C1490Y; SEPTEMBER et al., 2004), na Dinamarca (N965S; ROSENBERG et al., 2007), e no México (A1773V; CHACÓN-CAMACHO et al., 2013).

Todos os polimorfismos alélicos encontrados nos onze casos aqui investigados já foram descritos em outras populações residentes na África (L1395P), América do Norte (D1817E) e Europa (S445A, L541P). Em geral por representarem eventos raros, quando disponíveis, as frequências destes alelos descritas nos sujeitos Stargardt foram estimadas em valores bem abaixo de 1%, exceto para um grupo de italianos (n=32) com uma frequência de 4,72% para o alelo 1622T>C; L541P (FUMAGALLI et al., 2001). Entretanto, no grupo de sujeitos avaliados nesta tese a combinação alélica L1395P/D1817E foi encontrada em 64% dos 22 cromossomos analisados. Esta é a primeira vez que estas formas heterozigóticas compostas são detectadas em um grupo de sujeitos com a maculopatia de Stargardt e em frequência tão alta o que sugere a hipótese de ocorrência do efeito fundador nesta amostras de sujeitos nascidos e residentes em Belém do Pará.

Do ponto de vista da diagnose molecular, a presença de uma ou duas mutações em ambos os alelos destes pacientes, seguramente confirma o diagnóstico clínico da maculopatia de Stargardt. A identificação de uma mutação causal é importante para a confirmação de um diagnóstico clínico e o padrão de uma herança, predições para o curso

clínico da doença, aconselhamento genético e planejamento familiar e, uma futura terapia gênica. Contudo, a natureza complexa dos fenótipos retinianos e a heterogeneidade genética tornam difícil uma identificação eficiente de mutações pontualmente identificadas como causadoras de uma patologia. É comum a ocorrência de fenótipos de difícil delineamento além de sobreposição de características entre os indivíduos em diferentes estágios de progressão da patologia (BRAUN et al., 2013; BATTU et al., 2015).

Nos sujeitos aqui investigados não é possível uma clara correlação entre os tipos de mutações encontrados e os fenótipos apresentados. Pois há sujeitos classificados em diferentes estágios de evolução clínica e que apresentam os mesmos alelos (L1395P/D1817E em STG01 – estágio II, STG02 – estágio I, STG03 – estágio II, STG05 – estágio II, STG06 – estágio III e STG07 – estágio III). Da mesma forma há sujeitos exibindo as mesmas alterações na retina e que possuem alelos diferentes, como a não concordância entre os alelos detectados nos dois irmãos do grupo caso (L1395P/D1817E em STG06 e S445R em STG010, ambos em estágio III).

Entretanto, ao considerarmos a idade dos sujeitos e como era de se esperar, naqueles mais velhos, cujas idades variaram de 43 a 53 anos, todos apresentaram morfologia retiniana típica do estágio III independente da combinação de alelos encontrada. A explicação para estas constatações pode estar relacionada ao fato de que alguns polimorfismos alélicos mutacionais não tenham sido detectados por duas razões: a existência de variantes localizadas nas regiões de controle e regulação da expressão do gene ABCA4, que não foram objeto de estudo nesta tese e, a existência de outros polimorfismos deletérios localizados em outros genes contribuindo para o fenótipo clínico da maculopatia de Stargardt. Pode-se ainda questionar o poder de detecção das mutações através do método de sequenciamento utilizado, embora diversos estudos indiquem o sequenciamento dideoxi-terminal de Sanger como padrão-ouro na detecção de alelos mutantes para o gene ABCA4 (SHROYER et al., 2001;

YATSENKO et al., 2003; JAAKSON et al., 2003).

Embora pareça alta, essa taxa de detecção de 81% para as mutações nas 22 regiões cromossômicas (1p22; 93.992.837 – 94.121.149; GRCh38.p2) correspondentes ao gene ABCA4 é compatível àquelas descritas em outros estudos. Neles, os valores percentuais de detecção de mutações deletérias variou entre 70 a 80% entre dinamarqueses (ROSENBERG et al., 2007), 73,6% para os espanhóis (RIVEIRO-ALVAREZ et al., 2013), 76% entre os portugueses (MAIA-LOPES et al., 2009), 80% para norte-americanos (SHROYER et al., 2001) e, até o maior valor já descrito de 95,7% para os italianos (PASSERINI et al., 2010).

### 6.3 AS MEDIDAS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Nos mapas de expressão de genes em seres humanos disponíveis nas bases de dados como o NCBI, EMBL-EBI, TiGER, BioGPS e The Human Protein Atlas o ABCA4 aparece com os mais elevados níveis de expressão em órgãos como os olhos (retina), bulbo, músculos, glândulas adrenais, rins, trato gastrintestinal e ossos, além daqueles associados a tumores malignos (adrenais, pulmão, cartilagens, próstata). Até a conclusão desta discussão não havia na literatura informações sobre medidas de expressão gênica do ABCA4 em quaisquer tecidos do corpo humano de sujeitos portadores da maculopatia de Stargardt. Contudo, há dados referentes aos perfis de expressão de genes e proteínas da família ABC, incluindo o ABCA4, relacionados as respostas à terapia medicamentosa para carcinomas de ovário, mama e alguns tipos de leucemia (LIU et al., 2005; DE GROUW et al., 2006; RAAIJMAKERS, 2007).

Em se tratando da maculopatia de Stargardt, a sugestão para este tipo de análise é a de que níveis de expressão do ABCA4 abaixo do normal também estejam relacionados ao acúmulo de retinóides no fotorreceptor. Se esta via de transporte para a

reciclagem dos retinóides, embora acessória, é vital para a saúde dos cones e bastonetes, uma redução na quantidade de transportadores também provocaria o acúmulo de metabólitos prejudiciais à retina.

A ideia que motivou a realização das análises quantitativas de expressão do ABCA4 foi ainda mais instigada pelos dados obtidos na tese de doutorado de PEDROZA, L. S. R. A. (2014). Neste estudo, as análises do transcriptoma de transportadores ABC em células sanguíneas de sujeitos portadores de leucemia mieloide crônica e que apresentavam resistência a terapia com o mesilato de imatinibe, revelaram níveis significativamente diferenciados de expressão para estes transportadores dentre eles o ABCA4. Diante deste fato, decidiu-se avaliar a expressão em sangue periférico do ABCA4 partindo-se da hipótese de que estas células espelhariam a função do ABCA4 presente na retina dos sujeitos Stargardt.

A hipótese a ser testada baseou-se na premissa inicial de que era possível medir a expressão do ABCA4 em células da circulação sanguínea periférica. Dessa forma, duas possibilidades eram esperadas: ou os níveis de expressão detectados seriam compatíveis aos de um grupo de sujeitos controles ou, haveria uma diminuição de expressão do ABCA4 nos sujeitos comparados. De fato, os resultados encontrados apoiam a hipótese de uma redução substancial média de 17,12 vezes nos níveis de expressão da proteína transportadora ABCA4. Diante deste achado, é tentadora a ideia de que a expressão diferenciada do ABCA4 nos leucócitos dos sujeitos aqui investigados possa, através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa, ser utilizada como marcador para o diagnóstico da maculopatia de Stargardt.

#### 6.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS GRANULÓCITOS

À semelhança dos outros membros da família de transportadores ABC, o ABCA4 é capaz de transportar uma variedade de compostos orgânicos terpenoides, entre eles

o retinol e seus derivados metabólicos (cis e trans), o retinal e o ácido retinoico, além de outros lipídios esteroides (colesterol e derivados) e o glicerofosfolípido fosfatidiletanolamina (<http://www.uniprot.org/uniprot/P78363>). Porém, este transportador é o único entre os tipos ABC que é especializado na movimentação da vitamina A e seus derivados (TSYBOVSKY et al., 2010). Estes retinoides são essenciais a uma hematopoese normal, em especial o ácido retinóico todo-trans (ATRA), sobretudo na regulação da proliferação e diferenciação das linhagens mieloide e linfoide (RÖNN et al., 2015).

Sun et al. (1999), utilizando transportadores ABCA4 extraídos de retinas bovinas, demonstrou que, embora menor quando comparada ao retinal todo-trans, a atividade de transporte do ABCA4 é estimulada na presença do ácido retinoico todo-trans (ATRA). Para efeito de comparação, o valor máximo obtido nos experimentos de atividade de transporte do ABCA4 com uma concentração de 100 uM para o retinal todo-trans foi 4 vezes do que o nível basal. Quando utilizado em mesma concentração a cinética desta atividade para o ATRA foi duas vezes maior.

Diante das evidências aqui descritas é sugestiva a hipótese de que o ABCA4 também auxilie na maturação dos granulócitos contribuindo na assimilação do ATRA na linhagem hematopoética, esta assimilação auxiliaria na maturação celular mieloide. Isto poderia justificar a quantidade alterada de células bastonadas encontradas na circulação periférica dos sujeitos aqui investigados. Portanto, da mesma maneira que os níveis de expressão do ABCA4 poderiam representar um indicador de diagnose, a contagem dos morfotipos granulocíticos do tipo neutrófilos também poderia servir como indicador da maculopatia de Stargardt.

## 7 CONCLUSÃO

Nos sujeitos que fizeram parte deste estudo, os fenótipos clínicos identificados encontraram-se em conformidade com aqueles já consolidados na literatura para portadores da maculopatia recessiva de Stargardt. Nesta tese, com base nos achados das imagens das retinas, os sujeitos foram classificados nos estágios I, II e III conforme o grau de comprometimento retiniano. A relação entre acuidade visual e tempo de doença foi concordante, como era de se esperar, sobretudo naqueles casos de início mais precoce.

As variantes alélicas identificadas sugerem a ocorrência do efeito do fundador nesta amostra de sujeitos portadores de Stargardt residentes na cidade de Belém. Nesta amostra não foram encontrados novos polimorfismos nos éxons investigados. Também não foi possível o estabelecimento diferencial de qualquer associação entre as mutações identificadas e os fenótipos clínicos encontrados.

As diferenças observadas nas análises de expressão gênica do ABCA4 apontam para a possibilidade de utilizarmos a técnica de quantificação relativa por amplificação gênica em tempo real como indicador da maculopatia recessiva de Stargardt. Da mesma maneira o estudo quantitativo dos morfotipos granulocíticos do tipo neutrófilos presentes na circulação sanguínea periférica, sugere a sua utilização como biomarcador para Stargardt.

Os resultados obtidos no eletrorretinograma de campo total, através das variações de amplitudes em função do tempo de adaptação ao claro, permitiram a identificação de alterações funcionais nos portadores da maculopatia de Stargardt.

As medidas de espessura obtidas para a região macular dos sujeitos Stargardt foram significativamente menor do que aquelas determinadas nos sujeitos do grupo controle. Esses achados corroboram a ocorrência de perda de fotorreceptores na mácula retiniana.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABERG, T. M. Stargardt's disease and fundus flavimaculatus: evaluation of morphologic progression and intrafamilial co-existence. *Tr Am Ophth Soc.* V. 84, p. 453-487. 1986.

AHN, J., WONG, J. T., MOLDAY, R. S. The Effect of Lipid Environment and Retinoids on the ATPase Activity of ABCR, the Photoreceptor ABC Transporter Responsible for Stargardt Macular Dystrophy. *J Biol Chem.* V. 275, n. 27, p. 20399-20405, 2000.

AHN, J., BEHARRY, S., MOLDAY, L. L., MOLDAY, R. S. Functional Interaction between the Two Halves of the Photoreceptor-specific ATP Binding Cassette Protein ABCR (ABCA4). *J Biol Chem.* V. 278, n. 41, p. 39600-39608, 2003.

AKENZUA, G. I., HUI, Y. T., MILNER, R., ZIPURSKI, A. Neutrophil and band counts in the diagnosis of neonatal infections. *Pediatrics.* V. 54, p. 38-42. 1974.

ALLIKMETS, R., SINGH, N., SUN, H., SHROYER, N. F., HUTCHINSON, A., CHIDAMBARAM, A., GERRARD, B., BAIRD, L., STAUFFER, D., PEIFFER, A., RATTNER, A., SMALLWOOD, P., LI, Y., ANDERSON, K. L., LEWIS, R. A., NATHANS, J., LEPPERT, M., DEAN, M., LUPSKI, J. R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet.* V. 15, p. 236-246. 1997a.

ALLIKMETS, R., WASSERMAN, W. W., HUTCHINSON, A., SMALLWOOD, P., NATHANS, J., ROGAN, P. K., SCHNEIDER, T. D., DEAN, M. Organization of the ABCR gene: analysis of promoter and splice junction sequences. *Gene.* V. 215, p. 111-122. 1998.

ALONSO, A., MARTIN, P., ALBARRÁN, C., GARCÍA, P., PRIMORAC, D., GARCÍA, O., FERNÁNDEZ DE SIMÓN, L., GARCÍA-HIRSCHFELD, J., SANCHO, M., FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. *Croat Med J.* V. 44, n. 3, p. 273-280. 2003.

ANDERSON, K. L., BAIRD, L., LEWIS, R. A., CHINAULT, C., OTTERUD, B., LEPPERT, M., LUPSKI, J. R. A YAC contig encompassing the recessive Stargardt disease

gene (STGD) on chromosome 1p. *Am J Hum Genet.* V. 57, p. 1351-1363. 1995.

ARMINGTON, J. C., BIERSDORF, W. R. Long-term light adaptation of the human electroretinogram. *J Comp Physiol Psychol.* V. 51, n. 1, p. 1-5. 1958.

ARMSTRONG, J. D., MEYER, D., SHIZHAO, X., ELFERVIG, J. L. Long-term follow-up of Stargardt's disease and fundus flavimaculatus. *Ophthalmology.* V. 105, n. 3, p. 448-457. 1998.

AZARIAN, S. M., MEGARITY, C. F., WENG, J., HORVATH, D. H., TRAVIS, G. H. The human photoreceptor rim protein gene (ABCR): genomic structure and primer set information for mutation analysis. *Hum Genet.* V. 102, p. 699-705. 1998.

AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – MCT/CNPq. 2007.

BATTU, R., VERMA, A., HARIHARAN, R., KRISHNA, S., KIRAN, R., JACOB, J., GANAPATHY, A., RAMPRASAD, V, L., KUMARAMANICKAVEL, G., JEYABALAN, N., GHOSH, A. Identification of Novel Mutations in ABCA4 Gene: Clinical and Genetic Analysis of Indian Patients with Stargardt Disease. *Biomed Res Int.* V. 2015, ID 940864, p. 1-10. 2015.

BENOIT, J., LACHAPELLE, P. Light adaptation of the human photopic oscillatory potentials: influence of the length of the dark adaptation period. *Doc Ophthalmol.* V. 89, n. 3, p. 267-276. 1995.

BERGMANN. M., SCHUTT, F., HOLZ, F. G., KOPITZ, J. Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age related macular degeneration. *FASEB J.* V. 18, p. 562-564. 2004.

BIRCH, D. G., ANDERSON, J. L. Standardized full-field electroretinography: normal values and their variation with age. *Arch Ophthalmol.* V. 110, n. 11, p. 1571-1576. 1992.

BISWAS-FISS, E. E., AFFET, S., HA, M., BISWAS, S. B. Retinoid binding properties of nucleotide binding domain 1 of the Stargardt disease associated ABC transporter, ABCA4. *Biol Chem.* V. 287, p. 44097-44107. 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M112.409623>>. Acesso em: 21 fevereiro 2013.

BOK, D. Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 26, p.1659-1694. 1985.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* V. 33, n. 5, p. 657-670. 2010.

BOYER, N. P., HIGBEE, D., CURRIN, M. B., BLAKELEY, L. R., CHEN, C., ABLONCZY, Z., CROUCH, R.K., KOUTALOS, Y. Lipofuscin and N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure. *J Biol Chem.* V. 287, p. 22276-22286. 2012b.

BOYER, N. P., TANG, P. H., HIGBEE, D., ABLONCZY, Z., CROUCH, R. K., KOUTALOS, Y. Lipofuscin and A2E accumulate with age in the retinal pigment epithelium of *Nrl*<sup>-/-</sup> mice *Photochem Photobiol.* V. 88, n. 6, p. 1373–1377. 2012a.

BRAUN, T, A., MULLINS, R, F., WAGNER, A, H., ANDORF, J, L., JOHNSTON, R, M., BAKALL, B, B., DELUCA, A. P., FISHMAN, G, A., LAM, B, L., WELEBER, R, G., CIDECIYAN, A, V., JACOBSON, S, G., SHEFFIELD, V, C., TUCKER, B, A., STONE, E, M. Non-exonic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease. *Hum Mol Genet.* V. 22, n. 25, p. 5136-5145. 2013.

BRETSCHER, A., EDWARDS, K., FEHON, R. G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* V. 3, n. 8, p. 586-599. 2002.

BUNGERT, S., MOLDAY, L. L., MOLDAY, R. S. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter abcr and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters. *J Biol Chem.* V. 276, n. 26, p. 23539-23546. 2001.

BROWN, G., HUGHES, P. Retinoid differentiation therapy for common types of acute myeloid leukemia. *Leuk Res Treatment.* V. 2012, p. 1-11. 2012.

BURKE, T. R., FISHMAN, G. A., ZERNANT, J., SCHUBERT, C., TSANG, S. H., SMITH, R. T., AYYAGARI, R., KOENEKOOP, R. K., UMFRESS, A., CICCARELLI, M. L., BALDI, A., IANNACCONE, A., CREMERS, F. P. M., KLAVER, C. C. W., ALLIKMETS, R. Retinal phenotypes in patients homozygous for the G1961E mutation in the ABCA4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 53, p. 4458-4467. 2012.

CAMPANA, A., O. Metodologia da investigação científica aplicada à área biomédica – 2. Investigações na área médica. *J Pneumol.* V. 25, n. 2, p. 84-93. 1999.

COLEMAN, J. A., QUAZI, F., MOLDAI, R. S. Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim Biophys Acta.* V. 1831, p. 555-574. 2013.

CONLEY, S. M., CAI, X., MAKKIA, R., WU, Y., SPARROW, J. R., NAASH, M. I. Increased cone sensitivity to ABCA4 deficiency provides insight into macular vision loss in Stargardt's dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* V. 1822, n. 7, p. 1169 – 1179. 2012.

COSTA, R. A., SKAF, M., MELO, L, A, JR., CALUCCI, D., CARDILLO, J, A., CASTRO, J, C., HUANG, D., WOJTKOWSKI, M. Retinal assessment using optical coherence tomography. *Prog Retin Eye Res.* V. 25, n. 3, p. 325-353. 2006.

COSTA, M. F., TOMAZ, S., DE SOUZA, J. M., SILVEIRA, L. C. L., VENTURA, D. F. Electrophysiological evidence for impairment of contrast sensitivity in mercury vapor occupational intoxication. *Environ Res.* V. 107, p. 132-138. 2008.

CHRISTENSEN, R. D., ROTHSTEIN, G., ANSTALL, H. B., BUBEE, B. Granulocyte transfusions in neonates with bacterial infection, neutropenia, and depletion of mature bone marrow neutrophils. *Pediatrics.* V. 70, p. 1-6. 1981.

DA COSTA, G. M., DOS ANJOS, L. M., SOUZA, G. S., GOMES, B. D., SAITO, C. A., PINHEIRO, M. C. N., VENTURA, D. F., DA SILVA FILHO, M., SILVEIRA, L. C. L. Mercury toxicity in Amazon gold miners: visual dysfunction assessed by retinal and cortical electrophysiology. *Environ Res,* V. 107, p. 98-107. 2008.

DE CARVALHO, A. C, SOUZA, G. S., GOMES, B. D., DE LIMA, L. J. B., VENTURA, D. F., SILVEIRA, L. C. L. Investigação eletrofisiológica multifocal de pacientes com toxoplasmose ocular. *Rev Par Med*, V. 23, p.: 7-13. 2009.

DE CARVALHO, A. C. C., SCHWARZ, M. S., SOUZA, G. S. S., GOMES, B. D., ROSA, A. A. M., VENTURA, A. M. R. S., DE SOUZA, J. M., SILVEIRA, L. C. L., KREMERS, J. K. Multifocal electroretinography after high dose chloroquine therapy for malaria. *J Ophthalmic Vis Res*. V. 8, p. 193-198. 2013.

DASSA, E., BOUIGE, P. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol*. V. 152, p. 211-229. 2001.

DE GROUW, E. P., RAAIJMAKERS, M. H., BOEZEMAN, J. B., VAN DER REIJDEN, B. A., VAN DE LOCHT, L. T., DE WITTE, T. J., JANSEN, J. H., RAYMAKERS, R. A. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia*. V. 20, n. 4, p. 750-754. 2006.

DEEB, S. The molecular basis of variation in human color vision. *Clin Genet*. V. 67, p. 369-377. 2005

DEUTMAN, A. Stargardt's disease. *Orphanet Encyclopedia*. p. 1-3. 2003. Disponível em: <<https://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-Stargardt.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2013.

DUNO, M., SCHWARTZ, M., LARSEN. P. L., ROSENBERG, T. Phenotypic and genetic spectrum of Danish patients with ABCA4-related retinopathy. *Ophthalmic Genet*. V. 33, n. 4, p. 225-231. 2012.

ERGUN, E., HERMANN, B., WIRTITSCH, M., UNTERHUBER, A., KO, T. H., SATTMANN, H., SCHOLDA, C., FUJIMOTO, J. G., STUR, M., DREXLER, W. Assessment of central visual function in Stargardt's disease/fundus flavimaculatus with ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. V. 46, n. 1, p. 310-316. 2005.

FINNEMANN, S. C., LEUNG, L. W., RODRIGUEZ-BOULAN, E. The lipofuscin

component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 99, p. 3842-3847. 2002.

FISHMAN, G. A. Fundus flavimaculatus. A clinical classification. *Arch Ophthalmol*. V. 94, n. 12, p. 2061-2067. 1976.

FISHMAN, G. A., FARBMAN, J. S., ALEXANDER, K. R. Delayed dark rod adaptation in patients with Stargardt's disease. *Ophthalmology*. V. 98, p. 957-962. 1991.

FLIESLER, S. J., ANDERSON, R. E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res*. V. 22, p. 79-131. 1983.

FROTA DE ALMEIDA, I. N., FROTA DE ALMEIDA, L. N., FROTA DE ALMEIDA SOBRINHO, E., GOMES, B. D., SOUZA, G. S., ROSA, A. A. M., SILVEIRA, L. C. L. Optical coherence tomography and multifocal electroretinography of patients with advanced neovascular age-related macular degeneration before, during, and after treatment with Ranibizumab. *Arq Bras Oftalmol*. v. 78, p. 105-109. 2015.

FU, A. D., AL, E., MCDONALD, H. R., JOHNSON, R. N., JUMPER, J. M. Hereditary Macular Dystrophies. In: TASMANN, W; JAEGER, E. A. *Duane's Ophthalmology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. cap. 9. Disponível em: <<http://www.oculist.net/downat0502/prof/ebook/duanes/pages/v3/v3c009.html>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

FUJINAMI, K., AKAHORI, M., FUKUI, M., TSUNODA, K., IWATA, T., MIYAKE, Y. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmol*. V. 89, n. 3, p. 297-298. 2011.

FUJINAMI, K., ZERNANT, J., CHANA, R. K., WRIGHT, G. A., TSUNODA, K., OZAWA, Y., TSUBOTA, K., WEBSTER, A. R., MOORE, A. T., ALLIKMETS, R., MICHAELIDES, M. ABCA4 gene screening by next-generation sequencing in a British cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. V. 54, n. 10, p. 6662 - 6674. 2013.

GELISKEN, O., DE LAEY, J. J. A clinical review of Stargardt's disease and/or fundus flavimaculatus with follow-up. *Int Ophthalmol.* V. 8, n. 4, p. 225-235. 1985.

GERBER, S., ROZET, J. M., VAN DE POL, T. J. R., HOYNG, C. B., MUNNICH, A., BLANKENAGEL, A., KAPLAN, J., CREMERS, F. P. M. Complete exon–intron structure of the retina-specific atp binding transporter gene (ABCR) allows the identification of novel mutations underlying Stargardt disease. *Genomics.* V. 48, p. 139-142. 1998.

GERY, S., GOMBART, A. F., FUNG, Y. K., KOEFFLER, H. P. C/EBPepsilon interacts with retinoblastoma and E2F1 during granulopoiesis. *Blood.* V. 103, n. 3, p. 828-835. 2004.

GOLLAPALLI, D. R., MAITI, P., RANDO, R. R. RPE65 operates in the vertebrate visual cycle by stereospecifically binding all-trans-retinyl esters. *Biochemistry.* V. 42, p. 11824-11830. 2003.

GOMES, N. L., GREENSTEIN, V. C., CARLSON, J. N., TSANG, S. H., SMITH, R. T., CARR, R. E., HOOD, D. C., CHANG, S. A comparison of fundus autofluorescence and retinal structure in patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 50, n. 8, p. 3953-3959. 2009.

GOURAS, P. 1., MACKAY, C. J. Growth in amplitude of the human cone electroretinogram with light adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 30, n. 4, p. 625-630. 1989.

GUNDOGAN, F. C., TAS, A., SOBACI, G. Electroretinogram in hereditary retinal disorders. In: *Electroretinograms.* BELUSIC, G. (Ed.), p. 95-132, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/electroretinograms/electroretinogram-in-hereditary-retinal-disorders>. 2011.

HAINES, J. L., SPENCER, K. M., PERICAK-VANCE, M. A. Bringing the genetics of macular degeneration into focus. *PNAS.* V. 104, n. 43, p. 16725-16726. 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* V. 41, p. 95-98. 1999.

HAMEL, C. P. Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis.* V. 2, p. 1-7. 2007. BioMed Central. Open Access. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1750-1172-2-7.pdf&embedded=true>>. Acesso em: 25 jul. 2013.

HANSON, P. I., WHITEHEART, S. W. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol.* V. 6, n. 7, p. 519-529. 2005.

HECHT, S., HAIG, C., CHASE, A. M. The influence of light adaptation on subsequent dark adaptation of the eye. *J Gen Physiol.* V. 20, p. 831-850. 1937.

HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* V. 6, n. 10, p. 986-994. 1996.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* V. 8, p. 67-113. 1992.

HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* V. 10, n. 4, p. 413-7. 1992.

HOFFBRAND, A. V., MOSS, P. A. H., PETTIT, I. E. The white cells 1: granulocytes, monocytes and their benign disorders. In \_\_\_\_\_: *Essencial haematology.* 5<sup>th</sup> ed. USA: Blackwell Publishing, 2006. cap. 7, p. 94-107.

HOYNG, C. B., POPPELAARS, F., VAN DE POL, T. J. R., KREMER, H., PINCKERS, A. J. L., DEUTMAN, A. F., AND CREMERS, F. P. M. Genetic fine mapping of the gene for recessive Stargardt disease. *Hum Genet.* V. 98, p. 500-504. 1996.

HUANG, D., SWANSON, E. A., LIN, C. P., SCHUMAN, J. S., STINSON, W. G., CHANG, W. HEE, M. R. FLOTTE, T., GREGORY, K., PULIAFITO, C. A., FUJIMOTO, J. G. Optical coherence tomography. *Science.* V. 254, n. 5035, p. 1178-1181. 1991.

ITAHASHI, R., KATSUMI, O., MEHTA, M. C., WAJIMA, R., TAMAI, M., HIROSE, T. Stargardt's disease/fundus flavimaculatus: psychophysical and electrophysiologic results. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* V. 231, p. 555-562. 1993.

IWASAKI, H., SOMOZA, C., SHIGEMATSU, H., DUPREZ, E. A., IWASAKI-ARAI, J., MIZUNO, S., ARINOBU, Y., GEARY, K., ZHANG, P., DAYARAM, T., FENYUS, M. L., ELF, S., CHAN, S., KASTNER, P., HUETTNER, C. S., MURRAY, R., TENEN, D. G., AKASHI, K. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*. V. 106, n. 5, p. 1590-1600. 2005.

KAMINSKI, W. E., PIEHLER, A., WENZEL, J. J. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta*. V. 1762, p. 510-524. 2006.

KAYLOR, J. J., YUAN, Q., COOK, J., SARFARE, S., MAKSHANOFF, J., MIU, A., KIM, A., KIM, P., HABIB, S., ROYBAL, C. N., XU, T., NUSINOWITZ, S., TRAVIS, G. H. Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Müller glial cells of the retina. *Nat Chem Biol*. V. 9, n. 1, p. 30-36. 2013.

KAYLOR, J. J., COOK, J. D., MAKSHANOFF, J., BISCHOFF, N., YONG, J., TRAVIS, G. H. Identification of the 11-cis-specific retinyl-ester synthase in retinal Müller cells as multifunctional O-acyltransferase (MFAT). *PNAS*. V. 111, n. 20, p. 7302–7307. 2014

KAPADIA, S. Clinical review Stargardt's macular dystrophy. *Clin Eye Vis Care*. V. 12, p. 71-78. 2000.

KIM, L. S., FISHMAN, G. A. Comparison of visual acuity loss in patients with different stages of Stargardt's disease. *Ophthalmology*. V. 113, p. 1748-1751. 2006.

KIM, S. R., JANG, Y. P., JOCKUSCH, S., FISHKIN, N. E., TURRO, N. J., SPARROW, J. R. The all-trans-retinal dimer series of lipofuscin pigments in retinal pigment epithelial cells in a recessive Stargardt disease model. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 104, p. 19273-19278. 2007.

KISER, P. D., GOLCZAK, M., MAEDA, A., PALCZEWSK, K. Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochim Biophys Acta* . V. 1821, n. 1, p. 137-151. 2012.

KONDO, M., MIYAKE, Y., PIAO, C. H., TANIKAWA, A., HORIGUCHI, M., TERASAKI, H. Amplitude increase of the multifocal electroretinogram during light adaptation. *Invest*

Ophthalmol Vis Sci. v. 40, n. 11, p. 2633-2637. 1999.

KRILL, A. E., DEUTTMAN, A. F. The various categories of juvenile macular degeneration. Tr Amer Ophthal Soc. V. 70. p. 220-245. 1972.

KRETSCHMANN, U., SEELIGER, M. W., RUETHER, K., USUI, T., APFELSTEDT-SYLLA, E., ZRENNER, E. Multifocal electroretinography in patients with Stargardt's macular dystrophy. Br J Ophthalmol. V. 82, n. 3, p. 267-75. 1998.

LACHAPELLE, P., LITTLE, J. M., ROY, M. S. The electroretinogram in Stargardt's disease and fundus flavimaculatus. Doc Ophthalmol. V. 73, n. 4, p. 395-404. 1989.

LAMB, T. D. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. Prog Retin Eye Res. V. 36, p. 52-119. 2013.

LAMB, T. D., PUGH, E. N. JR. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. Prog Retin Eye Res. V. 23, n 3, p. 307-380. 2004.

LEWIS, R. A., SHROYER, N. F., SINGH, N., ALLIKMETS, R., HUTCHINSON, A., Li, Y., LUPSKI, J. R., LEPPERT, M., DEAN, M. Genotype/Phenotype Analysis of a Photoreceptor-Specific ATP-Binding Cassette Transporter Gene, ABCR, in Stargardt Disease. Am J Hum Genet. V. 64, p. 422-434. 1999.

LOIS, N., HOLDER, G. E., BUNCE, C., FITZKE, F. W., BIRD, A. C. Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. Arch Ophthalmol. V. 119, n. 3, p. 359-369. 2001.

LIU, Y., PENG, H., ZHANG, J., T. Expression profiling of ABC transporters in a drug-resistant breast cancer cell line using AmpArray. Mol Pharmacol. V. 68, n. 2, p. 430-438. 2005.

MAEDA, A., MAEDA, T., GOLCZAK, M., CHOU, S., DESAI, A., HOPPEL, C. L., MATSUYAMA, S., PALCZEWSKI, K. Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. J Biol Chem. V. 284, p. 15173-15183. 2009.

MAEDA, A., GOLCZAK, M., CHEN, Y., OKANO, K., KOHNO, H., SHIOSE, S., ISHIKAWA, K., HARTE, W., PALCZEWSKA, G., MAEDA, T., AND PALCZEWSKI, K. Primary amines protect against retinal degeneration in mouse models of retinopathies. *Nature Chem Biol.* V. 8, p. 170-178. 2011.

MAIA-LOPES, S., AGUIRRE-LAMBAN, J., CASTELO-BRANCO, M., RIVEIRO-ALVAREZ, R., AYUSO, C., SILVA, E. D. ABCA4 mutations in Portuguese Stargardt patients: identification of new mutations and their phenotypic analysis. *Mol Vis.* V. 15, p. 584-591. 2009.

MAIA, O. O. Jr., TAKAHASHI, W. Y., ARANTES, T. E. F., BARRETO, R. B. P., LINS NETO, J. Estudo macular na doença de Stargardt. *Arq Bras Oftalmol.* v. 71, p. 7-12, 2008.

MATA, N. L., WENG, J., TRAVIS, G. H. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* V. 97, p. 7154-7159. 2000.

MATA, N. L., RADU, R. A., CLEMMONS, R. S., TRAVIS, G. H. Isomerization and Oxidation of Vitamin A in Cone-Dominant Retinas: A Novel Pathway for Visual-Pigment Regeneration in Daylight Neuron. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 36, p. 69-80. 2002.

MCANANY, J. J., NOLAN, P. R. Changes in the harmonic components of the flicker electroretinogram during light adaptation. *Doc Ophthalmol.* V. 129, n. 1, p. 1-8. 2014.

MATA, N.L., TSIN, A.T. Distribution of 11-cis LRAT, 11-cis RD and 11-cis REH in bovine retinal pigment epithelium membranes. *Biochim Biophys Acta.* V. 1394, p. 16-22. 1998.

MENDES, T. S., FROTA DE ALMEIDA SOBRINHO, E., ROSA, A. A. M., DOS ANJOS, L. M., DA COSTA, G. M., SOUZA, G. S., GOMES, B. D., SAITO, C. A., DA SILVA FILHO, M., SILVEIRA, L. C. L. Dengue maculopathy: visual electrophysiology and optical coherence tomography. *Doc Ophthalmol.* V. 119, p. 145-155. 2009.

Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Resolução 196. Brasília: CNS. 1996.

Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Resolução 466. Brasília: CNS. 2012.

MOISEYEV, G., CROUCH, R. K., GOLETZ, P., OATIS, J. JR, REDMOND, T. M., MA, J. X. Biochemistry. Retinyl esters are the substrate for isomerohydrolase. V. 42, n. 7, p. 2229-2238. 2003.

MOLDAY, R. S., ZHONG, M., QUAZI, F. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Bioch Biophys Acta*. V. 1791, p. 573-583. 2009.

MOLDAY, R. S., ZHANG, K. Defective lipid transport and biosynthesis in recessive and dominant Stargardt macular degeneration. *Prog Lipid Res*. V. 49, n. 4, p. 476-92. 2010.

MOLDAY, L. L., ARNOLD, R. B., MOLDAY, R. S. ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nat Genetics*. V 25, p. 257-258. 2000.

MILLER, S., SANDBERG, M. A. Cone electroretinographic change during light adaptation in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. V. 32, n. 9, p. 2536-2541. 1991.

MUNIZ, A., VILLAZANA-ESPINOZA, E. T., HATCH, A. L., TREVINO, S. G., ALLEN, D. M., TSIN, A. T. A novel cone visual cycle in the cone-dominant retina. *Exp Eye Res*. V. 85, p. 175-184. 2007.

MURAYAMA, K., SIEVING, P. A. Different rates of growth of monkey and human photopic a-, b-, and d-waves suggest two sites of ERG light adaptation. *Clin Vis Sci*. V. 7, p. 385-392. 1992.

MUSTAFI, D., ENGEL, A. H., PALCZEWSKI, K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res.* V. 28, n. 4, p. 289-302. 2009.

NOBLE, K. G., CARR, R. E. Stargardt's disease and fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol.* V. 97, p. 1281-1285. 1979.

NOY, N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J.* V. 348, p. 481-495. 2000.

OH, K. T., WELEBER, R. G., OH, D. M., BILLINGSLEA, A. M., ROSENOW, J., STONE, E. M. Clinical phenotype as a prognostic factor in Stargardt disease. *Retina.* V. 24, p. 254-262. 2004.

ORAM, J. F. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol.* V. 13, p. 373-381. 2002.

PALCZEWSKA, G., MAEDA, T., IMANISHI, Y., SUN, W., CHEN, Y., WILLIAMS, D. R., PISTON, D. W., MAEDA, A., AND PALCZEWSKI, K. Noninvasive multiphoton fluorescence microscopy resolves retinol and retinal condensation products in mouse eyes. *Nat. Med.* v. 16, p. 1444-1449. 2010.

PALCZEWSKI, K. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem.* V. 75, p. 743-767. 2006.

PALCZEWSKI, K. Chemistry and biology of vision. *J Biol Chem.* V. 287, n. 3, p. 1612-1619. 2011.

PAPERMASTER, D. S., SCHNEIDER, B. G., ZORN, M. A., KRAEHENBUHL, J. P. Immunocytochemical localization of a large intrinsic membrane protein to the incisures and margins of frog rod outer segment disks. *J Cell Biol.* V. 78. p. 415-425. 1978.

PAPERMASTER, D. S., REILLY, P., SCHNEIDER, B. G. Cone lamellae and red and green rod outer segment disks contain a large intrinsic membrane protein on their margins: an ultrastructural immunocytochemical study of frog retinas. *Vision Res.* V. 22, n. 12, p. 1417-1428. 1982.

PAWAR, A. S., QTAISHAT, N. M., LITTLE, D. M., PEPPERBERG, D. R. Recovery of Rod Photoresponses in ABCR-Deficient Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 49, p. 2743-2755. 2008.

PEACHEY, N. S., ALEXANDER, K. R., FISHMAN, G. A., DERLACKI, D. J. Properties of the human cone system electroretinogram during light adaptation. *Appl Opt.* V. 28, n. 6, p. 1145-1150. 1989.

PEACHEY, N. S., ALEXANDER, K. R., DERLACKI, D. J., FISHMAN, G. A. Light adaptation, rods, and the human cone flicker ERG. *Vis Neurosci.* V. 8, n. 2, p. 145-150. 1992a.

PEACHEY, N. S., ARAKAWA, K., ALEXANDER, K. R., MARCHESE, A. L. Rapid and slow changes in the human cone electroretinogram during light and dark adaptation. *Vision Res.* V. 32, n. 11, p. 2049-2053. 1992b.

PIEHLER, A. P., HELLUM, M., WENZEL, J. J., KAMINSKI, H., HAUG, K. B. F., KIERULF, P., KAMINSKI, W. E. The human ABC transporter pseudogene family: evidence for transcription and gene-pseudogene interference. *BMC Genomics.* V 9, p. 165-178. 2008.

PUECH, B., KOSTRUBIEC, B., HACHE, J. C., FRANCOIS, P. Epidemiology and prevalence of hereditary retinal dystrophies in the Northern France. *J Fr Ophtalmol.* V. 14, n. 3, p. 153-164. 1991.

PUGH, JR, E. N., LAMB, T. D. Phototransduction in vertebrate rods and cones: Molecular mechanisms and amplification, recovery and light adaptation. In: STAVENGA, D. G., DE GRIP, W. J., PUGH JR., E.N. (Eds.), *Handbook of Biological Physics. Vol. 3*, p. 183-255. *Molecular Mechanisms of Visual Transduction.* Elsevier, Amsterdam. 2000.

QUAZI, F., LENEVICH, S., MOLDAY, R. S. ABCA4 is an *N*-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. *Nat Commun.* V. 3, p. 925-933. 2012.

QUERQUES, G., PRATO, R., COSCAS, G., SOUBRANE, G., SOUIED, E. H. In vivo

visualization of photoreceptor layer and lipofuscin accumulation in stargardt's disease and fundus flavimaculatus by high resolution spectral-domain optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol.* V. 3, p. 693-9. 2009.

RAAIJMAKERS, M., H. ATP-binding-cassette transporters in hematopoietic stem cells and their utility as therapeutical targets in acute and chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* V. 21, n. 10, p. 2094-2102. 2007.

RAN, X., CAI, W. J., HUANG, X. F., LIU, Q., LU, F., QU, J., WU, J., JIN, Z. B. RetinoGenetics: a comprehensive mutation database for genes related to inherited retinal degeneration. *Database.* V. 17, p. 1-6. 2014.

RASTER, M., HORN, F., JÜNEMANN, A., ROSA, A.A.M., SOUZA, G.S.S., GOMES, B.D., LIMA, M.G., SILVEIRA, L.C.L., KREMERS, J. Retinal disorders in northern Brazilian patients treated with chloroquine assessed by multifocal ERG. *Doc Ophthalmol.* V. 122, p. 77-86. 2011.

RATTNER, A., SMALLWOOD, P. M., NATHANS, J. Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J Biol Chem.* V. 275, p. 11034-11043. 2000.

RATTNER, A., NATHANS, J. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosc.* V. 7, p. 860-872. 2006.

RODRIGUES, M. L. V. *Semiologia oftalmológica.* Medicina, Ribeirão Preto. V. 29, p. 54-60, 1996.

RÖNN, R. E., GUIBENTIF, C., MORAGHEBI, R., CHAVES, P., SAXENA, S., GARCIA, B., WOODS, N., B. Retinoic acid regulates hematopoietic development from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* V. 4, n. 2, p. 269-281. 2015.

ROSENBERG, T., KLIE, F., GARRED, P., SCHWARTZ, M. N965S is a common ABCA4 variant in Stargardt-related retinopathies in the Danish population. *Mol Vis.* V. 17, n. 13, p. 1962-1969. 2007.

ROTENSTREICH, Y., FISHMAN, G. A., ANDERSON, R. J. Visual acuity loss and clinical observations in a large series of patients with Stargardt disease. *Ophthalmology*. V. 110, p. 1151-1158. 2003.

RÓŻANOWSKA, M., HANDZEL, K., BOULTON, M. E., RÓŻANOWSKI, B. Cytotoxicity of all-trans-retinal increases upon photodegradation. *Photochem Photobiol*. V. 88, n. 6, p. 1362-1372. 2012.

SAARI, J. C., BREDBERG, D. L. Lecithin: retinol acyltransferase in retinal pigment epithelial microsomes. *J Biol Chem*. V. 264, p. 8636-8640. 1989.

SAARI, J. C., NAWROT, M., STENKAMP, R. E., TELLER, D. C., GARWIN, G. G. Release of 11-cis-retinal from cellular retinaldehyde-binding protein by acidic lipids. *Mol Vis*. V. 15, p. 844-854. 2009.

SAARI, J. C. Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles. *Annu Rev Nutr*. V. 32, p. 125-148. 2012.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. V. 74, n. 12, p. 5463-5467. 1977.

SCHEFE, J. H., LEHMANN, K. E., BUSCHMANN, I. R., UNGER, T., FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med*. V. 84, n. 11, p. 901-910. 2006.

SCHMITTGEN, T. D., LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. V. 3, p. 1101-1108. 2008.

SCHOLL, H. P. N., KREMERS, J., VONTHEIN, R., WHITE, K., WEBER, B. H. F. L- and M-cone-driven electroretinograms in Stargardt's macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. V. 42, n. 6, p. 1380-1389. 2001.

SIEMS, W., SOMMERBURG, O., SCHILD, L., AUGUSTIN, W., LANGHANS, C. D., WISWEDEL, I. Beta-carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing

mitochondrial respiration. *FASEB J.* V. 16, p. 1289-1291. 2002.

SHROYER, N. F., LEWIS, R. A., ALLIKMETS, R., SINGH, N., DEAN, M., LEPPERT, M., LUPSKI, J. R. The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial. *Vis Res.* V. 39, p. 2537-2544. 1999.

SCHMITZ-VALCKENBERG, S., HOLZ, F. G., BIRD, A. C., SPAIDE, R. F. Fundus autofluorescence imaging: review and perspectives. *Retina.* V. 28, n. 3, p. 385-409. 2008.

SOLOMON, S. G., LENNIE P. The machinery of colour vision. *Nat Rev Neurosci.* V. 8, n. 4, p. 276-286. 2007.

SPARROW, J. R., WU, Y., KIM, C. Y., ZHOU, J. Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. *J Lipid Res.* V. 51, p. 247-261. 2010.

SPARROW, J. R., GREGORY-ROBERTSA, E., YAMAMOTOA, K., BLONSKAA, A., GHOSHA, S. K., UEDAA, K., ZHOUA, J. The Bisretinoids of Retinal Pigment Epithelium. *Prog Retin Eye Res.* V. 31, n. 2, p. 121-135. 2012.

STONE, E. M., NICHOLS, B. E., KIMURA, A. E., WEINGEIST, T. A., DRACK, A., SHEFFIELD, V. C. Clinical features of a Stargardt-like dominant progressive macular dystrophy with genetic linkage to chromosome 6q. *Arch Ophthalmol.* V. 112, p. 765-772. 1994.

STAVROU, P., GOOD, P. A., MISSON, G. P., KRITZINGER, E. E. Electrophysiological findings in Stargardt's-fundus flavimaculatus disease. *Eye (Lond).* V. 12, n. Pt 6, p. 953-958. 1998.

STROM, S. P., GAO, Y. Q., MARTINEZ, A., ORTUBE, C., CHEN, Z., NELSON, S. F., NUSINOWITZ, S., FARBER, D. B, GORIN, M. B. Molecular diagnosis of putative Stargardt Disease probands by exome sequencing. *BMC Med Genet.* V. 13, p. 67. 2012.

STROM, S. P., GORIN, M. B. Evaluation of autosomal dominant retinal dystrophy genes in an unaffected cohort suggests rare or private missense variants may often be benign.

Molecular Vision. V. 19, p. 980-985. 2013.

SULLIVAN, J. M. Focus on Molecules: ABCA4 (ABCR) - an import-directed photoreceptor retinoid flipase. *Exp Eye Res.* V. 89, p. 602-603. 2009.

SUN, H., MOLDAY, R. S., NATHANS J. Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem.* V. 274, n. 12, p. 8269-8281.

TALEB, A., FARIA, M. R., ÁVILA, M., MELLO, P. A. A. As condições de saúde ocular no Brasil. CBO. 2012. 37 p. Disponível em: <http://www.cbo.com.br/novo/medico/pdf/01-cegueira.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2015.

TARLING, E. J., VALLIM, T. Q. A., EDWARDS, P. A. Role of ABC transporters in lipid transport and human disease. *Trends Endocrinol Metab.* V. 24, n. 7, p. 342-350. 2013.

TESTA, F., ROSSI, S., SODI, A., PASSERINI, I., DI IORIO, V., DELLA CORTE, M., BANFI, S., SURACE, E. M., MENCHINI, U., AURICCHIO, A., SIMONELLI, F. Correlation between photoreceptor layer integrity and visual function in patients with Stargardt disease: implications for gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 53, n. 8, p. 4409-4415. 2012.

TRAVIS, G. H., GOLCZAK, M., MOISE, A. R., PALCZEWSKI, K. Diseases caused by defects in the visual cycle. Retinoids as potential therapeutic agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* V. 47, p. 469-512. 2007.

TSYBOVSKY, Y., WANG, B., QUAZI, F., MOLDAY, R. S., PALCZEWSKI, K. Posttranslational modifications of the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4. *Biochemistry.* V. 50, n. 32, p. 6855-6866. 2011.

TSYBOVSKY, Y., ORBAN, T., MOLDAY, R. S., TAYLOR, D., PALCZEWSKI, K. Molecular organization and ATP-induced conformational changes of ABCA4, the photoreceptor-specific ABC transporter. *Structure.* V. 21, n. 5, p. 854-860. 2013.

TIMMERS, A. M., VAN GRONINGEN-LUYBEN, D. A., DE GRIP, W. J. Uptake and isomerization of all-trans retinol by isolated bovine retinal pigment epithelial cells: further clues to the visual cycle. *Exp Eye Res.* V. 52, n. 2, p. 129-138. 1991.

TYLER, C. W., HAMER, R. D. Analysis of visual modulation sensitivity. IV Validity of the Ferry-Porter law. *J Opt Soc Am.* V. 7, n. 4, p. 743-758. 1990.

VALVERDE, D., RIVEIRO-ALVAREZ, R., BERNAL, S., JAAKSON, K., BAIGET, M., NAVARRO, R., AYUSO, C. Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 gene in Spanish patients with Stargardt disease: evidence of a prevalent mutated allele. *Mol Vis.* V. 11, n.12, p. 902-908. 2006.

VASILIOU, V., VASILIOU, K., NEBERT, D. W. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics.* V. 3, p. 281-290. 2009.

VASIREDDY, V., WONG, P., AYYAGARI R. Genetics and molecular pathology of Stargardt-like macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* V. 29, n. 3, p. 191-207. 2010.

VENTURA, D. F., COSTA, M. T. V., BEREZOVSKY, A., SALOMÃO, S. R., DO CANTO PEREIRA, L. H. M., COSTA, M. F., SIMÕES, A. L. A. C., LAGO, M., FARIA, M. A. M., DE SOUZA, J. M., SILVEIRA, L. C. L. Multifocal and full-field electroretinogram changes associated with color-vision loss in mercury vapor exposure. *Vis Neurosc.* v. 21, p. 421-429. 2014.

VERDINA, T., TSANG, S. H., GREENSTEIN, V. C., ZERNANT, J., SODI, A., LIMA, L. H., CHANG, S., ALLIKMETS, R., MENCHINI, UGO. Functional Analysis of Retinal Flecks in Stargardt Disease. *J Clin Exp Ophthalmol.* V. 3, n. 6, p. 1-5. 2012.

VOLLMER, L. A., SHECHTMAN, D. L., WOODS, A. D., PIZZIMENTI, J. J. Use of multifocal ERG and OCT for diagnosing Stargardt's disease. *Clin Exp Optom.* V. 94, n. 3, p. 309-313. 2011.

VON LINTIG, J. Metabolism of carotenoids and retinoids related to vision. *J Biol Chem.* V. 287, n. 3, p. 1627-1634. 2012.

WALIA, S., FISHMAN, G. A. Natural history of phenotypic changes in Stargardt macular dystrophy. *Ophthalmic Genet.* V. 30, p. 63-68. 2009.

WANG, B., DUKAREVICH, M., SUN, E. I., YEN, M. R., SAIER, M. H. JR. Membrane porters of ATP-binding cassette transport systems are polyphyletic. *J Membr Biol.* V. 231, n. 1, p. 1-10. 2009.

WANG, J. S., KEFALOV, V. J. The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res.* V. 30, p. 115-128.

WEBER, B. H. F., SANDER, S., KOPP, C., WALKER, D., ECKSTEIN, A., WISSINGER, B., ZRENNER, E., GRIMM, T. Analysis of 21 Stargardt's disease families confirms a major locus on chromosome 1p with evidence for non-allelic heterogeneity in a minority of cases. *Br J Ophthalmol.* V. 80, p. 745-749. 1996.

WELEBER, R. G. Stargardt's macular dystrophy. *Arch Ophthalmol.* V. 112, p. 752-754. 1994.

WOLF, G. The visual cycle of the cone photoreceptors of the retina. *Nutr. Rev.* V. 62, p. 283-286. 2004.

WU, Y., FISHKIN, N. E., PANDE, A., PANDE, J., SPARROW, J. R. Novel lipofuscin bisretinoids prominent in human retina and in a model of recessive Stargardt disease. *J Biol Chem.* V. 284, n. 30, p. 20155-20166. 2009.

ZAWADZKI, R. J., CHOI, S. S., FULLER, A. R., EVANS, J. W., HAMANN, B., WERNER, J. S. Cellular resolution volumetric in vivo retinal imaging with adaptive optics—optical coherence tomography. *Opt Express.* V. 17, n. 5, p. 4084–4094. 2009.

ZHANG, K., BITHER, P. P., PARK, R., DONOSO, L. A., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E. A dominant Stargardt's macular dystrophy locus maps to chromosome 13q34. *Arch Ophthalmol.* V. 112, p. 759-764. 1994.

ZHANG, K., YEON, H., HAN, M., LARRY, A., DONOSOT, L. A. Molecular genetics of macular dystrophies. *British J Ophthalmol.* V. 80, p. 1018-1022. 1996.

ZHONG, M., MOLDAY, L. L., MOLDAY, R. S. Role of the C terminus of the photoreceptor abca4 transporter in protein folding, function, and retinal degenerative diseases. *J Biol Chem.* V. 284, n. 6, p. 3640-3649. 2009.

WARD, A. C., LOEB, D. M., SOEDE-BOBOK, A. A., TOUW, I. P., FRIEDMAN, A. D. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia.* V. 14, n. 6, p. 973-990. 2000.

WANG, J. Y. The capable ABL: what is its biological function? *Mol Cell Biol.* V. 34, n. 7, p. 1188-1197. 2014.

WHO. Visual impairment and blindness. Fact sheet n. 282. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/>>. Acesso em: 11 jan. 2014.

WEINER, A., SANDBERG, M. A. Normal change in the foveal cone ERG with increasing duration of light exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* V. 32, n. 10, p. 2842-2845. 1991.

YAMAMOTO, S., HAYASHI, M., TAKEUCHI, S. Cone electroretinogram amplitude growth with light adaptation in patients with retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmol Scand.* V. 78, n. 4, p. 403-406. 2000.

## ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PROJETO: VARIAÇÃO ALÉLICA E EXPRESSÃO DO GENE ABCA4 ENTRE INDIVÍDUOS PORTADORES DA SÍNDROME DE STARGARDT: UMA ANÁLISE DOS GRANULÓCITOS COMO INDICADORES DE EXPRESSÃO GÊNICA NOS FOTORRECEPTORES.

### Esclarecimento da pesquisa

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem o objetivo de investigar os aspectos genéticos relacionados a sua dificuldade de enxergar. Como você já sabe, através do diagnóstico feito pelo seu médico oftalmologista, esta alteração é conhecida como síndrome de Stargardt. Neste estudo avaliaremos também se há alguma relação entre a síndrome de Stargardt e alterações morfológicas nas células sanguíneas. Nesta pesquisa serão coletadas informações sobre o histórico da sua doença junto ao seu médico oftalmologista. Ele solicitará a você que procure o Centro de Hemoterapia do Pará (HEMOPA) para a coleta de sangue para que possamos realizar os testes de laboratório. Você também será encaminhado ao Laboratório de Neurologia Tropical situado no Núcleo de Medicina Tropical para a realização de outros exames oftalmológicos, além daqueles já realizados por você. Estes exames avaliarão a sua capacidade de enxergar objetos em uma tela de computador por um curto período de tempo. São exames que não causam dor ou qualquer tipo de prejuízos a sua visão. A retirada do sangue para os exames será feita com todo o cuidado, por pessoas treinadas e com material adequado, sem germes e descartável, desta forma, oferecendo um risco mínimo para a sua saúde ou bem estar. No sangue, serão feitos exames genéticos complexos. Caso seja necessário, serão feitas algumas perguntas a você sobre a sua doença e sobre alguns hábitos seus, as suas condições de moradia e trabalho, nos dias de hoje e no passado. Você terá total liberdade para recusar participar desta pesquisa, sem problema nenhum. A finalidade desses exames é descobrir possíveis causas para os casos de alterações na visão dos pacientes. Os resultados obtidos após a realização desta pesquisa serão informados ao seu médico. Esta pesquisa não tem como objetivo lhe proporcionar melhoras ou a cura em sua condição clínica, mas poderá ajudar a esclarecer melhor como devemos proceder em relação ao acompanhamento dos pacientes que apresentam a síndrome de Stargardt no sentido de promover sempre a melhor qualidade de vida possível a estas pessoas. Se você aceitar participar da pesquisa, o seu nome e a sua participação no estudo ficarão em total sigilo. Danos que forem, comprovadamente, provocados pela pesquisa serão reparados. Você também poderá interromper a sua participação no estudo a qualquer momento que quiser sem que haja perdas ou qualquer forma de represálias. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou de maiores esclarecimentos, você poderá contatar os pesquisadores responsáveis.

Dr. José Alexandre Lemos Biomédico CRBM-172 (4a Região) Coordenador do projeto 3242-9100 (Hemopa)	Nelson Monte de Carvalho Filho Biólogo Responsável pela execução do projeto 3201-6819 (Núcleo de Medicina Tropical)
--	--

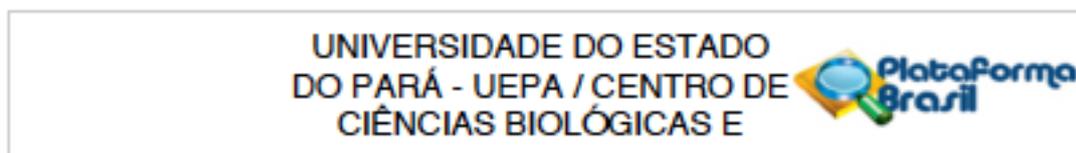
### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa sabendo que poderei ser convidado a doar amostras de sangue para análise.

Belém,     /     /

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

## APÊNDICE A – Parecer Técnico do Comitê de Ética na Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** VARIÇÃO ALÉLICA E EXPRESSÃO DO GENE ABCA4 ENTRE INDIVÍDUOS PORTADORES DA SÍNDROME DE STARGARDT: UMA ANÁLISE DOS GRANULÓCITOS COMO INDICADORES DE EXPRESSÃO GÊNICA NOS FOTORRECEPTORES.

**Pesquisador:** Alexandre Lemos

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 19597113.9.0000.5174

**Instituição Proponente:** Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará - Fundação HEMOPA

**Patrocinador Principal:** Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará - Fundação HEMOPA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 433.376

**Data da Relatoria:** 18/10/2013

#### Apresentação do Projeto:

Indivíduos oftalmologicamente diagnosticados como portadores da síndrome de Stargardt serão recrutados para avaliarmos a ocorrência de associações entre variantes alélicas (mutações) e níveis de expressão gênica do gene ABCA4 com alterações morfológicas celulares em seus granulócitos. Estes pacientes são assistidos pelo serviço de oftalmologia do Hospital Universitário Betina Ferro de Souza pertencente a Universidade

Federal do Pará. Todos serão encaminhados através do médico oftalmologista ao Centro de Hemoterapia do Pará (HEMOPA) para coleta de sangue periférico. As análises genéticas envolverão o sequenciamento total dos 50 éxons do gene ABCA4 para a caracterização de variantes alélicas associadas a síndrome de Stargardt, e também medidas de expressão do gene ABCA4 através da metodologia de PCR em tempo real a partir das frações de RNA mensageiro extraídas do material coletado. A morfologia nuclear dos granulócitos será analisada através de microscopia óptica convencional

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Avaliação da ocorrência de associação entre a variação alélica presente no gene ABCA4, o comprometimento funcional a expressão da proteína ABCA4 e a maturação dos

**Endereço:** Trav. Perebebul, 2623

**Bairro:** Marco

**CEP:** 66.067-670

**UF:** PA

**Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3276-0829

**Fax:** (91)3276-8052

**E-mail:** cep\_uepa@hotmail.com

UNIVERSIDADE DO ESTADO  
DO PARÁ - UEPa / CENTRO DE  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E



Continuação do Parecer: 433.376

granulócitos em indivíduos portadores da síndrome de Stargardt.

Objetivo Secundário: Identificação das variantes alélicas presentes no gene ABCA4 nos indivíduos diagnosticados com a síndrome de Stargardt; Determinação dos níveis de expressão do RNA mensageiro do gene ABCA4 de granulócitos dos indivíduos diagnosticados com a síndrome de Stargardt; Caracterização morfológica nuclear dos granulócitos em indivíduos diagnosticados com a síndrome de Stargardt;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Para esta pesquisa, será feita coleta de sangue periférico, cujos riscos são inerentes ao procedimento, porém pequenos e esporádicos como pequenos hematomas no local da flebotomia, os quais costumam desaparecer sem qualquer intervenção.

Benefícios: Se de fato encontramos uma associação entre as variantes alélicas, os níveis de expressão e a morfologia dos granulócitos nos indivíduos investigados é provável que estejamos diante de um marcador para a síndrome de Stargardt. O envolvimento dos pacientes portadores da síndrome de Stargardt neste projeto possibilitará um maior esclarecimento sobre a genética desta herança autossômica recessiva.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa com relevância científica e bem escrita, sendo possível atingir os objetivos com a metodologia proposta

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Atende aos preceitos éticos da Resolução 466/12

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências ou inadequações

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Trav. Perebebuí, 2623

Bairro: Marco

CEP: 66.067-670

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3276-0829

Fax: (91)3276-8052

E-mail: cep\_uepa@hotmail.com

UNIVERSIDADE DO ESTADO  
DO PARÁ - UEPa / CENTRO DE  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E



Continuação do Parecer: 433.376

BELEM, 23 de Outubro de 2013

---

**Assinador por:**  
**RENATO DA COSTA TEIXEIRA**  
(Coordenador)

Endereço: Trav. Perebeui, 2623

Bairro: Marco

CEP: 66.087-670

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3276-0829

Fax: (91)3276-8052

E-mail: [cep\\_uepa@hotmail.com](mailto:cep_uepa@hotmail.com)