

U. PORTO

FMUP FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2017/2018

Pedro Afonso Santos Paulo

Perspetivas de tratamento na Neuropatia Ótica Hereditária de Leber
Treatment perspectives in Leber Hereditary Optic Neuropathy

março, 2018

FMUP

Pedro Afonso Santos Paulo

Perspectivas de tratamento na Neuropatia Ótica Hereditária de Leber
Treatment perspectives in Leber Hereditary Optic Neuropathy

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Oftalmologia

Tipologia: Monografia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Doutor Sérgio Estrela Silva

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Revista Sociedade Portuguesa de Oftalmologia

março, 2018

FMUP

Eu, **Pedro Afonso Santos Paulo**, abaixo assinado, nº mecanográfico **201607402**, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2018

Assinatura conforme cartão de identificação:

Pedro Afonso Santos Paulo

NOME

Pedro Afonso Santos Paulo

NÚMERO DE ESTUDANTE

E-MAIL

201607402

pedroafonsosantos@gmail.com

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Medicina Clínica - Oftalmologia

TÍTULO MONOGRAFIA

Perspetivas de tratamento na Neuropatia Ótica Hereditária de Leber

ORIENTADOR

Doutor Sérgio Estrela Silva

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTES TRABALHOS APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☒
É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES TRABALHOS (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.	☐
DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTES TRABALHOS.	☐

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/03/2018

Assinatura conforme cartão de identificação:

Pedro Afonso Santos Paulo

Dedicatória:

Ao Doutor Sérgio Estrela Silva, por ter aceitado o meu convite, pela sua orientação, disponibilidade e cooperação na realização deste trabalho.

Aos meus amigos, pelo incentivo e apoio incondicional ao longo deste percurso.

Ao meu irmão, eterno companheiro e melhor amigo, sempre disponível para me apoiar.

À minha família, em especial aos meus pais, por desde sempre me fazerem acreditar nas minhas capacidades.

Resumo:

A Neuropatia Ótica Hereditária de Leber (LHON) é uma doença neurodegenerativa e com hereditariedade não mendeliana, sendo a patologia mais comum associada a alterações primárias do genoma mitocondrial. Apresenta-se como perda aguda ou subaguda de visão central e sequencial, ocorrendo envolvimento do segundo olho, na grande maioria dos casos, no período de um ano. Manifesta-se sobretudo em jovens adultos do sexo masculino, sendo diagnosticada clinicamente. É causada, maioritariamente, por uma das três mutações primárias e pontuais do mtDNA, m.3460G>A, m.11778G>A e m.14484T>C, genes que codificam subunidades do complexo I da CRM, culminando em defeitos na síntese de ATP e apoptose de células ganglionares. Têm sido investigadas várias abordagens terapêuticas, farmacológicas, genéticas e celulares, e, ainda que, os resultados obtidos não sejam inteiramente conclusivos, a sua instituição precoce pode diminuir a perda de acuidade visual bilateral, por redução do stress do nervo ótico.

Tem-se como objetivo deste trabalho, a revisão de terapias disponíveis e em investigação, tais como Idebenona, EPI-743, Brimonidina e a principal chave para o tratamento, a terapia génica através de adenovírus.

Embora seja uma patologia de baixa incidência e prevalência, é essencial o avanço no estudo da terapêutica, enfoque o impacto negativo da perda de visão aguda, com consequente prejuízo na qualidade de vida dos portadores de LHON.

Abstract

Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is a neurodegenerative, non-mendelian inherited disease, the most common pathology associated with primary alterations of mitochondrial genome. An acute or sub-acute central and sequential vision loss occurs, affecting the second eye in most cases, within a year. It is clinically diagnosed and occurs mainly in young male adults. LHON is mostly caused by one of the three primary and punctual mutations of mtDNA, m.3460G>A, m.11778G>A and m.14484T>C, the genes which encode subunits of CRM complex I, leading to ATP synthesis defects and ganglion cell apoptosis. Multiple pharmacological, genetic and cellular therapeutic approaches are under investigation. Although the results are yet inconclusive, early therapeutic onset can reduce bilateral visual acuity loss by diminishing optic nerve stress.

The goal here is to review the available therapeutic options, such as Idebenone, EPI-743, Brimonidine and the main key to the treatment, adenovirus-associated gene therapy.

Despite the low incidence and prevalence of this disease, the evolution of the therapeutic approaches is essential, due to the existing negative impact of the acute vision loss, which decreases quality of life in LHON patients.

Palavras-chave: “LHON”; “Leber”; “mtDNA”; “mutações”; “tratamento”; “edibenona”; “terapia génica”; “hereditariedade não mendeliana”

Key words: “LHON”; “Leber”; “mtDNA”; “mutations”; “treatment”; “edibenone”; “gene therapy”; “non-mendelian inherited”

Epidemiologia

A Neuropatia Ótica Hereditária de Leber (LHON) (OMIM 535000) foi descrita pela primeira vez pelo oftalmologista alemão Theodore Leber (1840-1917). Leber descreveu um padrão característico de perda visual entre os membros de quatro famílias distintas. Nestes primeiros estudos de LHON destacaram-se a transmissão materna da doença, a prevalência no sexo masculino e o envolvimento quase exclusivo do nervo ótico (1).

O padrão não mendeliano de hereditariedade foi explicado apenas em 1988, quando se descreveu a primeira doença causada por mutações pontuais no DNA mitocondrial (mtDNA), a LHON (m.11778G>A) (2).

As neuropatias óticas hereditárias apresentam uma prevalência estimada de 1/10000. No panorama de distúrbios primários mitocondriais, a LHON é a doença mais comum. No Reino Unido estima-se uma prevalência de 1/31.000 doentes com LHON (3), na Holanda estima-se 1/39.000 (4) e na Finlândia de 1/50.000 doentes com LHON (5).

Cerca de 90%-95% dos casos de LHON devem-se a mutações pontuais do mtDNA, sendo a mais comum a m.11778G>A. Outros fatores genéticos podem influenciar a expressão fenotípica da LHON, como os genes nucleares que regulam a expressão dos genes mitocondriais (6, 7).

Caracterização LHON

A LHON é uma doença genética mitocondrial, neurodegenerativa e com hereditariedade não mendeliana associada a mutações no DNA mitocondrial, com transmissão exclusiva pelo sexo feminino. A sua principal característica é a perda visual bilateral progressiva e debilitante (6-9). Caracteriza-se por uma perda aguda ou subaguda de visão central, sequencial em que o envolvimento do segundo olho ocorre geralmente entre 2 a 4 meses mais tarde; em 97% dos casos, o envolvimento do segundo olho ocorre nos primeiros 12 meses (7, 10, 11).

A LHON ocorre principalmente em jovens adultos do sexo masculino, com pico de início na idade adulta, sendo que doentes com idades de início de sintomatologia mais precoce (antes dos 20 anos), tem melhor prognóstico (11).

Pode ser classificada em quatro fases de acordo com as manifestações clínicas: pré-sintomática, aguda, crônica e de recuperação visual. A fase pré-sintomática é caracterizada pela disfunção sutil do nervo ótico. O primeiro sinal da doença é a microangiopatia telangiectásica peripapilar. Existem também evidências de que portadores assintomáticos da doença possuem níveis flutuantes de edema das fibras nervosas retinianas. Em alguns casos, verifica-se também perda de visão cromática, afetando principalmente o sistema vermelho-verde, reduzida sensibilidade ao contraste e parâmetros eletrofisiológicos anormais (12, 13).

Os portadores da doença permanecem assintomáticos até sentirem visão turva e desfocada num dos olhos, o que caracteriza o início da fase aguda, na qual ocorre a perda de visão. Na fundoscopia é possível observar a telangiectasia peripapilar, a microangiopatia, o edema do disco ótico e o aumento da tortuosidade vascular. Verifica-se também o desenvolvimento de escotoma centrocecal. O reflexo pupilar é preservado e não há dor com os movimentos oculares.

A maioria dos doentes sofre uma perda de visão central para níveis de cegueira legal (igual ou inferior a 20/200), ainda que alguns doentes tenham uma recuperação espontânea, essencialmente durante o primeiro ano após o aparecimento dos sintomas (14).

Na fase crónica da doença, ocorre progressão para atrofia ótica. Durante esta fase, níveis elevados de glutamato na fenda sináptica, resultantes da disfunção mitocondrial, causam hiperexcitabilidade neuronal que juntamente com níveis elevados de radicais livres de oxigénio, levam à ativação de cascatas de apoptose celular (15). Este processo resulta na morte das células ganglionares da retina e consequentemente na atrofia dos nervos ópticos, culminando na perda permanente de visão (16). Nesta fase da doença, há progressão para escotoma central absoluto. A grande maioria dos doentes fica completamente cego no prazo de um ano após o início da doença, mas numa pequena percentagem de doentes com LHON, a visão melhora ao longo do tempo (17).

A recuperação visual, embora seja rara, pode verificar-se até mesmo alguns anos após o início dos sintomas e é influenciada pelo status mutacional. A recuperação dos parâmetros visuais não é apenas restrita à acuidade, podendo também incluir o desenvolvimento de pequenas ilhas com campo de visão normal (fenestrações) no escotoma central, ou reversão da discromatopsia (11). É mais provável que, a recuperação, ocorra nos casos em que a doença tenha tido início antes dos vinte anos de idade e tenha tido uma progressão mais lenta (18).

Frequentemente, a LHON restringe-se à presença de alterações oftalmológicas. No entanto, existem casos de LHON-plus nos quais se verificam anomalias neurológicas adicionais, tais como convulsões, atraso mental, neuropatia periférica, tremor postural, parkinsonismo, ataxia cerebelar, anartria, distonia e encefalopatia ligeira.

Também foram descritas alterações na RMN-CE nomeadamente lesões na substância branca semelhantes às que são observadas na esclerose múltipla (19, 20). Um estudo demonstrou que 59% dos doentes com LHON, portadores de uma das três mutações primárias, possuem anomalias neurológicas. Identificou-se também a sobreposição de LHON com a doença mitocondrial MELAS (21).

O diagnóstico de LHON é clínico. À fundoscopia observa-se um pseudoedema do disco, de coloração laranja escuro, bordos esfumados, e múltiplas microtelangiectasias peripapilares (22). A perimetria estática computadorizada revela um alargamento da mancha cega, evoluindo para escotomas cecocentrais e perdas capimétricas variáveis, dependendo da extensão de atrofia observada. Na OCT do disco óptico observa-se um espessamento das fibras peri-papilares, com os quadrantes temporal e inferior a serem afetados primeiramente

e posteriormente, geralmente após três meses, o envolvimento das fibras dos quadrantes nasal e superior (23).

Etiologia

A LHON é causada maioritariamente (90%-95% dos casos), por uma de três mutações primárias e pontuais do mtDNA, m.3460G>A, m.11778G>A e m.14484T>C, que ocorrem em genes que codificam as subunidades ND1 e ND6 do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (CRM) (7, 10, 24). Por sua vez, a disfuncionalidade do complexo I, reduz a capacidade inerente de produção de ATP e consequentemente verifica-se um aumento do stress oxidativo intracelular e uma produção aumentada de radicais livres de oxigénio (25). Ainda que a síntese de ATP esteja diminuída nos três casos descritos, a maior incapacidade advém da mutação m.11778G>A, culminando no fenótipo de doença mais grave, seguida da m.14484T>C e por último da m.3460G>A (26).

Na maioria dos doentes com LHON, a mutação no mtDNA é homoplasmática, isto é, todas as cópias do mtDNA são mutadas, sendo a percentagem de casos em que é heteroplasmática de apenas 14% (27). Entre os portadores de mutações heteroplasmáticas, verifica-se perda visual apenas quando o conteúdo de mtDNA mutado é superior a 60%, sendo este o limite descrito para que ocorram anomalias bioenergéticas (28). No entanto, nem todos os portadores de mutações LHON desenvolvem a doença, de acordo com a penetrância incompleta e heteroplasmia. A penetrância incompleta da LHON pode, ainda, também sofrer influência de fatores ambientais (29, 31).

Uma das particularidades da LHON é a sua elevada incidência no sexo masculino. Estima-se que cerca de 50% dos homens portadores desenvolvem a doença, contrastando com os 10% de mulheres portadoras de mutações da LHON (28-30). A hereditariedade não mendeliana, subjacente à LHON, e a característica do genoma mitocondrial de herança exclusivamente materna, não estabelecem uma justificação para a doença acometer principalmente indivíduos do sexo masculino sendo que seja necessário a influencia de outros factores epigenéticos que contribuam para esta diferença populacional. Relativamente à predominância do sexo masculino nos doentes com LHON, com uma taxa de conversão em 50% dos portadores das mutações do sexo masculino, em oposição aos 10% de conversão para doença no sexo feminino, foi proposta a hipótese de que as hormonas sexuais femininas, estrogénios, possam conferir um papel protetor no desenvolvimento da LHON (49, 61).

Em 2011, Giordano C et al, constataram que a adição de 17 β -estradiol interfere na disfunção mitocondrial, permitindo a ativação da biogénese mitocondrial, aumentando a atividade da superóxido dismutase 2 (SOD2), principal enzima antioxidante mitocondrial, e adulterando, desta forma, o stress oxidativo e a apoptose celular (62). Considerando a elevada concentração, nas células ganglionares, de receptores estrogénio- β , a suplementação

com compostos semelhantes a estrogênio poderá tornar-se uma aposta futura na terapêutica da LHON.

Tratamento

Novas terapias e ensaios clínicos têm sido desenvolvidos, fundamentados pela natureza sequencial e bilateral da LHON. Em cerca de 50% dos casos, as terapias são focadas na prevenção do aparecimento da doença no segundo olho (32). Por outro lado, algumas terapias são direcionadas para as células ganglionares da retina, através de injeção intravítrea ou administração tópica (33).

Várias combinações de vitaminas e outros suplementos foram usadas no tratamento de doenças mitocondriais, inclusive a LHON, tais como coenzima Q10 (CoQ10), a L-carnitina, a creatina, o ácido lipóico, a dimetilglicina, a cisteína, o succinato, o dicloroacetato, a vitamina K1, a vitamina K3, a vitamina C, a vitamina B1, a vitamina B2 e a vitamina. No entanto os resultados clínicos foram pouco sustentados devido à baixa eficácia (6, 9, 34).

A co-enzima Q10 é responsável pelo transporte de elétrons entre o complexo I e II da CRM, e está descrito que o déficit desta enzima causa encefalomiopatia mitocondrial devido à interrupção da fosforilação oxidativa (6, 9, 34). O tratamento desta doença com esta enzima foi benéfico, no entanto para a LHON, os resultados não são tão positivos. (6, 9, 34)

Alguns autores descreveram que a abordagem terapêutica da LHON deve basear-se na recuperação da CRM independente do complexo I através do uso de benzoquinonas de cadeia curta. Estes compostos são capazes de recuperar o fluxo de elétrons mitocondriais, na presença de um complexo I disfuncional (35-37). A respiração celular mitocondrial assenta na transferência repetida de equivalentes do NADPH do citoplasma para a mitocôndria e é dependente da atividade específica da NADH desidrogenase (35, 37). Algumas quinonas de cadeia curta são eficientemente reduzidas pela NADH desidrogenase, antes de entrar na mitocôndria para consequentemente serem novamente oxidadas pelo complexo III da CRM. Esta reoxidação pelo complexo III repõe o fluxo de elétrons do complexo III ao citocromo c (35, 37). Uma das características essenciais dessas quinonas é a sua capacidade lipofílica que faz com que atravessem repetidamente as membranas mitocondriais (35), permitindo assim o transporte de electrões do complexo I para os complexos II e III.

Uma das benzoquinonas de cadeia curta que pode estimular esta forma de respiração independente do complexo I é a idebenona (8). Estudos in vitro, concluíram que Idebenona e EPI-743, análogos de ubiquinona, possuem uma potência superior em comparação com a CoQ10 (9, 38).

Idebenona

A idebenona é uma benzoquinona de cadeia curta, desenvolvida quimicamente que difere da CoQ10 devido à presença de uma cauda menor e significativamente menos lipofílica. A Idebenona permite a passagem de electrões para o complexo III, evitando o complexo I, prevenindo a produção de espécies reactivas de oxigénio e a apoptose de células ganglionares (37, 39). A administração oral de idebenona é de rápida absorção tendo também a capacidade inerente de ultrapassar a barreira hematoencefálica (40). Em 1992, Mashima et al. descreveu pela primeira vez a possível eficácia da idebenona na LHON, quando uma criança (10 anos) portador de m.11778G4A, foi tratado com 90mg/dia de idebenona (41). No entanto, sabe-se que a idade precoce do desenvolvimento da doença e a mutação m.11778G>A, são dois fatores que predispõem a resolução da perda da acuidade visual na LHON (18).

Num estudo mais alargado de Mashima et al, num grupo de 14 doentes com LOHN, foram sujeitos a um tratamento combinado com vitamina B2, vitamina C e Idebenona em doses de 180 mg/dia. Os resultados apenas conseguiram provar que quando houve recuperação da acuidade visual, esta aconteceu de forma mais rápida (42). Barnils et al, usaram a terapia associada com Idebenona e vitaminas em dois doentes no entanto não estabeleceram nenhuma vantagem neste tratamento (43). Num estudo em ratos tratados com Rotenona (inibidor complexo I), a Idebenona preveniu a apoptose celular e contribuiu para a recuperação da acuidade visual (39). Carelli et al. avaliaram um grupo de 44 doentes com LHON submetidos ao tratamento com idebenona, comparando os que desenvolveram perda de visão com os que não tinham tido diminuição da acuidade visual. Os resultados foram conclusivos, tendo Carelli et al. descrito que os doentes portadores da m.11778G>A apresentaram maior taxa de recuperação da acuidade visual, aumentando a taxa de recuperação quando submetidos ao tratamento na fase inicial da doença (44, 45). Os doentes portadores da m.14484T>C, por sua vez e de acordo com o pressuposto, apresentaram maior taxa de recuperação espontânea.

Embora o estudo tenha sido retrospectivo e não randomizado, com doentes submetidos a diferentes doses de idebenona, os autores concluíram que a idebenona pode ser um tratamento eficaz para LHON. Num estudo italiano, Carelli et al, demonstrou, numa amostra de 103 doentes com LOHN, recuperação da acuidade visual no tratamento com Idebenona, e definiu o início precoce da doença e o tempo prolongado de tratamento, como fatores de bom prognóstico em doentes com LHON (46).

Uma das vantagens do uso da idebenona é a sua rápida absorção como confirmada por estudos em ratos que evidenciaram que 5 minutos após uma única administração oral, a idebenona foi detetável no humor aquoso e vítreo (39).

Num ensaio clínico aleatório, controlado por placebo, o grupo investigou o potencial terapêutico da idebenona na LHON. A maioria dos pacientes eram homens (87,2%) portadores da mutação m.11778G>A (76,9%). Confirmou-se o potencial terapêutico da idebenona

na na prevenção da perda de visão e na recuperação da acuidade visual, particularmente em pacientes com elevado risco de perda de visão total (13).

Têm sido efetuados estudos clínicos para avaliar o perfil de segurança da idebenona que concluem que é geralmente segura e bem tolerada com apenas alguns leves a moderados efeitos adversos. A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) aprovou em Setembro de 2015 a Idebenona (2,3-dimetoxi-5-metil-6- (10-hidroxidecil) -1,4-benzoquinona) como tratamento em adultos portadores de LHON (13, 47). Considerando todos estes estudos conclui-se que a Idebenona, melhora a acuidade visual em doentes com visão discordante nos dois olhos, doentes no curso inicial da doença e num longo período de tratamento (46, 48, 49).

O estudo RHODOS, realizado em 2011, um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, avaliou doentes que apresentavam uma das três mutações do DNA mitocondrial (G11778A, G3460A e T14484C), manifestadas na maioria dos doentes com LHON. Foram distribuídos aleatoriamente 85 doentes, dos quais 53 foram tratados com idebenona 900 mg/dia e 29 foram tratados com placebo, durante 24 semanas. Ainda que não se tenham obtido resultados com significância estatística, a melhoria da acuidade visual foi comprovada, tendo a Idebenona um papel comprovado na proteção dos pacientes para uma perda de visão adicional (48).

Setenta por cento dos pacientes do estudo RHODOS, foram submetidos a uma avaliação posterior, num estudo denominado RHODOS-OFU, evidenciando-se que 24 semanas de tratamento com Idebenona proporcionou benefício clínico consistente em média até 2,5 anos, após interrupção do tratamento (63).

EPI-743

A EPI-743 é uma quinona de terceira geração que possui uma atividade antioxidante in vitro aproximadamente 1000 vezes superior à idebenona (38, 50). O medicamento foi administrado a cinco doentes com LHON com perda recente de acuidade visual. Objetivamente, houve uma melhoria sustentada em apenas 2 doentes, um portador da m.11778G>A e outro portador da m.14484T>C (38).

Num outro estudo sobre dois irmãos com LHON portadores da mutação m.14484T>C e predispostos a uma recuperação espontânea, apenas um foi sujeito ao tratamento com EPI-743. Os resultados demonstraram uma recuperação da acuidade visual mais rápida após a administração do EPI.743 (51).

Brimonidina

Alguns estudos, propuseram o uso da Brimonidina como tratamento da LHON, baseado na sua ação neuroprotectora uma vez que aumenta a quantidade de fatores anti-apoptóticos e bloqueia a excitotoxicidade mediada pelo glutamato (32).

Testes clínicos com a Brimonidina não resultaram numa melhoria da acuidade visual, contudo, o seu efeito hipotensor intraocular pode funcionar como adjuvante nos portadores assintomáticos de LHON, doentes diagnosticados com hipertensão ocular ou glaucoma (52).

Ciclosporina A

Ciclosporina A é considerado um inibidor da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, protegendo as células da apoptose celular, através da ligação à peptidil-prolil isomerase, a ciclofilina D, localizada na matriz da mitocôndria (64).

Em 2018 foi avaliada a eficácia profilática da terapia com Ciclosporina A, na prevenção do envolvimento do segundo olho na LHON. Os doentes incluídos no estudo receberam uma dose de 2,5 mg/kg/dia de Ciclosporina A e foram avaliados em intervalos de 3 meses. Os resultados não foram positivos, uma vez que todos os doentes sofreram envolvimento do segundo olho e, além do mais, após o início do tratamento, experienciaram uma diminuição da acuidade visual corrigida para o olho primeiramente afectado (65).

Terapia genética

A terapia genética tem sido amplamente estudada como alvo terapêutico para as doenças mitocondriais. Para a LHON em particular, é uma opção de tratamento ainda mais promissora porque a camada de células ganglionares é de fácil de acesso. No entanto, a capacidade de introduzir genes diretamente no genoma mitocondrial apresenta um grande obstáculo que é a dupla membrana da mitocôndria. Assim, foi desenvolvida a expressão alotópica que corresponde à expressão de genes no núcleo da célula que normalmente são expressos apenas no genoma mitocondrial. Esta terapia baseia-se na transfecção do gene de interesse para o genoma nuclear utilizando um adenovírus (AAV). Para tal, o gene de interesse é desenhado com uma sequência alvo específica para a mitocôndria, sendo o conteúdo proteico posteriormente transferido para a mitocôndria. O gene é então transfectado para o núcleo com AAV (49, 53-55).

Uma das primeiras tentativas de sucesso utilizando esta técnica in vitro foi em cíbridos, que são células formadas pela fusão de dois tipos celulares diferentes, a partir de uma

célula Rho-0 (célula desprovida de mtDNA) para a qual é transferido o genoma mitocondrial de doentes ou de indivíduos saudáveis (controlo) (56). Nesta experiência os cíbridos eram homoplasmáticos para a mutação m.11778G>A, na qual foi utilizada a expressão alotópica para complementar a subunidade ND4 mutada com uma wild type verificando-se uma recuperação da fosforilação oxidativa (53).

Com o objetivo de criar um modelo experimental com LHON, usou-se uma abordagem otimizada através de expressão alotópica e electroporação in vivo para introduzir o gene humano ND4 mutado (m.11778G>A) nos olhos de ratos. Uma análise histológica destas retinas mostrou uma diminuição significativa (30%-40%) no número de células ganglionares comparada com os animais em que a electroporação in vivo foi efetuada com o gene ND4 normal. O número reduzido de células ganglionares estava associado a uma função visual comprometida. A perda de células ganglionares foi recuperada, substancialmente, por uma segunda electroporação com o gene ND4 normal, prevenindo assim a diminuição da função visual (55). Este estudo revela que a expressão alotópica é eficaz in vivo e que se prevê uma alternativa viável para a LHON (55, 57). Um outro estudo, em que utilizaram o mesmo princípio de expressão alotópica, a superóxido dismutase (SOD2) foi inserida em cíbridos com a m.11778G>A. A SOD2 é uma importante defesa no organismo uma vez que funciona como antioxidante. Neste estudo, verificou-se que esta terapêutica diminuiu a taxa de apoptose aumentando a sobrevivência das células ganglionares em LHON (58).

Uma alternativa à expressão nuclear alotópica é a introdução de todo o mtDNA dentro da mitocôndria. Um estudo isolou o mtDNA de dadores humanos saudáveis e desenvolveu um fator de transcrição recombinante que poderia entrar diretamente nas mitocôndrias. Esta construção foi então aplicada aos linfócitos LHON que eram homoplasmáticos para a mutação m.11778G>A, e levou a um aumento da função mitocondrial e da fosforilação oxidativa (59). Em 2012, um outro estudo descreveu o uso de uma sequência mitocondrial num vector AAV que continha o gene wild type ND4. A sequência alvo mitocondrial direcionou a introdução do gene wild type ND4 nas mitocôndrias in vitro. Esta técnica foi também realizada num modelo de rato LHON que foi eficaz na prevenção da atrofia óptica e na perda de visão (60).

Neste momento, considerando as características únicas da LHON, como doença mitocondrial e pelo envolvimento sequencial do segundo olho, a terapia genética, destaca-se como o futuro promissor no tratamento da LHON, havendo vários estudos em curso para avaliar o potencial desta terapia como tratamento desta doença (45).

Conclusão

A LHON é uma doença genética mitocondrial caracterizada por perda subaguda bilateral de visão central devido à degenerescência do nervo óptico. A grande maioria dos casos de LHON deve-se a uma de três mutações pontuais no mtDNA, 3460G>A, 11778A>G e

14484 T>C, que envolvem genes que codificam as subunidades do complexo I da CRM.

Com o desenvolvimento dos testes genéticos moleculares, o diagnóstico clínico tornou-se mais acessível, especialmente em casos atípicos. No entanto, muitos aspectos da etiologia complexa da LHON permanecem ainda por esclarecer. A penetrância incompleta e o viés sexual indicam claramente que a mutação de mtDNA por si é insuficiente para a manifestação da doença. A identificação de outros fatores que modulam a expressão fenotípica da LHON é atualmente uma área de investigação intensa. Os tratamentos atualmente disponíveis reduzem o stress no nervo óptico. A terapia génica é a principal chave para o tratamento da LHON. No entanto, a terapia génica ainda apresenta muitas limitações que impedem a técnica de curar completamente a doença.

O progresso em todas as áreas é um pré-requisito tanto para a melhoria do aconselhamento genético como para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas.

Bibliografia

1. Imai Y, Moriwaki D. A probable case of cytoplasmic inheritance in man: A critique of leber's disease. *Journal of Genetics*. 1936;33(2):163.
2. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988;242(4884):1427-30.
3. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *American journal of human genetics*. 2003;72(2):333-9.
4. Spruijt L, Kolbach DN, de Coo RF, Plomp AS, Bauer NJ, Smeets HJ, et al. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. *American journal of ophthalmology*. 2006;141(4):676-82.
5. Puomila A, Hamalainen P, Kivioja S, Savontaus ML, Koivumaki S, Huoponen K, et al. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *European journal of human genetics : EJHG*. 2007;15(10):1079-89.
6. Fraser JA, Biousse V, Newman NJ. The Neuro-Ophthalmology of Mitochondrial Disease. *Survey of ophthalmology*. 2010;55(4):299-334.
7. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies – Disease mechanisms and therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2011;30(2-2):81-114.
8. Peragallo JH, Newman NJ. Is there treatment for Leber hereditary optic neuropathy? *Current opinion in ophthalmology*. 2015;26(6):450-7.
9. Yu-Wai-Man P, Votruba M, Moore AT, Chinnery PF. Treatment strategies for inherited optic neuropathies: past, present and future. *Eye*. 2014;28(5):521-37.
10. Harding AE, Sweeney MG, Govan GG, Riordan-Eva P. Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. *American journal of human genetics*. 1995;57(1):77-86.
11. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *Journal of medical genetics*. 2009;46(3):145-58.
12. Huoponen K. Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. *Neurogenetics*. 2001;3(3):119-25.
13. Rudolph G, Dimitriadis K, Buchner B, Heck S, Al-Tamami J, Seidensticker F, et al. Effects of idebenone on color vision in patients with leber hereditary optic neuropathy. *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*. 2013;33(1):30-6.
14. Kirkman MA, Korsten A, Leonhardt M, Dimitriadis K, De Coo IF, Klopstock T, et al. Quality of life in patients with leber hereditary optic neuropathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(7):3112-5.

15. Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European journal of pharmacology*. 2013;698(1-3):6-18.
16. Güven N. Optic Neurodegeneration: Time to Act 2014. 101 p.
17. Mascialino B, Leinonen M, Meier T. Meta-analysis of the prevalence of Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations in Europe. *European journal of ophthalmology*. 2012;22(3):461-5.
18. Barboni P, Savini G, Valentino ML, La Morgia C, Bellusci C, De Negri AM, et al. Leber's hereditary optic neuropathy with childhood onset. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006;47(12):5303-9.
19. Grazina MM, Diogo LM, Garcia PC, Silva ED, Garcia TD, Robalo CB, et al. Atypical presentation of Leber's hereditary optic neuropathy associated to mtDNA 11778G>A point mutation--A case report. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*. 2007;11(2):115-8.
20. Koilkonda RD, Guy J. Leber's Hereditary Optic Neuropathy-Gene Therapy: From Benchtop to Bedside. *Journal of Ophthalmology*. 2011;2011:16.
21. Blakely EL, de Silva R, King A, Schwarzer V, Harrower T, Dawidek G, et al. LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial MTND1 gene mutation. *European Journal Of Human Genetics*. 2005;13:623.
22. Newman NJ. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *American journal of ophthalmology*. 2005;140(3):517-23.
23. Barboni P, Carbonelli M, Savini G, Ramos Cdo V, Carta A, Berezovsky A, et al. Natural history of Leber's hereditary optic neuropathy: longitudinal analysis of the retinal nerve fiber layer by optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2010;117(3):623-7.
24. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain : a journal of neurology*. 1995;118 (Pt 2):319-37.
25. Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2005;10(5):997-1007.
26. Cwerman-Thibault H, Augustin S, Lechauve C, Ayache J, Ellouze S, Sahel J-A, et al. Nuclear expression of mitochondrial ND4 leads to the protein assembling in complex I and prevents optic atrophy and visual loss. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*. 2015;2:15003.
27. Smith KH, Johns DR, Heher KL, Miller NR. Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *Archives of ophthalmology*. 1993;111(11):1486-90.
28. Yu-Wai-Man P, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *Journal of medical genetics*. 2002;39(3):162-9.

29. Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends in genetics : TIG*. 2003;19(5):257-62.
30. Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, Howell NN. Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? *American journal of medical genetics*. 2001;98(3):235-43.
31. Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, Vidoni S, Mattioli S, Barbieri A, et al. The background of mitochondrial DNA haplogroup J increases the sensitivity of Leber's hereditary optic neuropathy cells to 2,5-hexanedione toxicity. *PloS one*. 2009;4(11):e7922.
32. Newman NJ, Biousse V, David R, Bhatti MT, Hamilton SR, Farris BK, et al. Prophylaxis for second eye involvement in leber hereditary optic neuropathy: an open-labeled, non-randomized multicenter trial of topical brimonidine purite. *American journal of ophthalmology*. 2005;140(3):407-15.
33. Newman NJ. Treatment of hereditary optic neuropathies. *Nature reviews Neurology*. 2012;8(10):545-56.
34. Pfeiffer G, Majamaa K, Turnbull DM, Thorburn D, Chinnery PF. Treatment for mitochondrial disorders. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012(4):CD004426.
35. Erb M, Hoffmann-Enger B, Deppe H, Soeberdt M, Haefeli RH, Rummey C, et al. Features of Idebenone and Related Short-Chain Quinones that Rescue ATP Levels under Conditions of Impaired Mitochondrial Complex I. *PloS one*. 2012;7(4):e36153.
36. Giorgio V, Petronilli V, Ghelli A, Carelli V, Rugolo M, Lenaz G, et al. The effects of idebenone on mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1817(2):363-9.
37. Haefeli RH, Erb M, Gemperli AC, Robay D, Courdier Fruh I, Anklin C, et al. NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PloS one*. 2011;6(3):e17963.
38. Sadun AA, Chicani CF, Ross-Cisneros FN, Barboni P, Thoolen M, Shrader WD, et al. Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. *Archives of neurology*. 2012;69(3):331-8.
39. Heitz FD, Erb M, Anklin C, Robay D, Pernet V, Gueven N. Idebenone protects against retinal damage and loss of vision in a mouse model of Leber's hereditary optic neuropathy. *PloS one*. 2012;7(9):e45182.
40. Kobayashi T, Yoshida K, Mitani M, Torii H, Tanayama S. Metabolism of idebenone (CV-2619), a new cerebral metabolism improving agent: isolation and identification of metabolites in the rat and dog. *Journal of pharmacobio-dynamics*. 1985;8(6):448-56.
41. Mashima Y, Hiida Y, Oguchi Y. Remission of Leber's hereditary optic neuropathy with idebenone. *Lancet*. 1992;340(8815):368-9.
42. Mashima Y, Kigasawa K, Wakakura M, Oguchi Y. Do idebenone and vitamin therapy shorten the time to achieve visual recovery in Leber hereditary optic neuropathy? *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*. 2000;20(3):166-70.

43. Barnils N, Mesa E, Munoz S, Ferrer-Artola A, Arruga J. [Response to idebenone and multivitamin therapy in Leber's hereditary optic neuropathy]. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia*. 2007;82(6):377-80.
44. Barboni P, Valentino ML, La Morgia C, Carbonelli M, Savini G, De Negri A, et al. Idebenone treatment in patients with OPA1-mutant dominant optic atrophy. *Brain*. 2013;136(Pt 2):e231.
45. Jason H. Peragallo M, Nancy J. Newman M. Is there treatment for Leber Hereditary Optic Neuropathy? *Curr Opin Ophtalmology*. 2015 November;26(6):450-7.
46. Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Rizzo G, Carbonelli M, De Negri AM, et al. Idebenone treatment in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 9):e188.
47. Gueven N. Idebenone for Leber's hereditary optic neuropathy. *Drugs of today*. 2016;52(3):173-81.
48. Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Bailie M, et al. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 9):2677-86.
49. P Y-W-M, PG G, PF C. Mitochondrial optic neuropathies- disease mechanisms and therapeutic strategies. *Progress Retin Eye Research*. 2011;30(2):81-114.
50. Enns GM, Kinsman SL, Perlman SL, Spicer KM, Abdenur JE, Cohen BH, et al. Initial experience in the treatment of inherited mitochondrial disease with EPI-743. *Molecular genetics and metabolism*. 2012;105(1):91-102.
51. Chicani CF, Chu ER, Miller G, Kelman SE, Sadun AA. Comparing EPI-743 treatment in siblings with Leber's hereditary optic neuropathy mt14484 mutation. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie*. 2013;48(5):e130-3.
52. Thouin A, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. Raised intraocular pressure as a potential risk factor for visual loss in Leber Hereditary Optic Neuropathy. *PloS one*. 2013;8(5):e63446.
53. Guy J, Qi X, Pallotti F, Schon EA, Manfredi G, Carelli V, et al. Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Annals of neurology*. 2002;52(5):534-42.
54. Bonnet C, Augustin S, Ellouze S, Benit P, Bouaita A, Rustin P, et al. The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(10):1707-17.
55. Ellouze S, Augustin S, Bouaita A, Bonnet C, Simonutti M, Forster V, et al. Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. *American journal of human genetics*. 2008;83(3):373-87.
56. Swerdlow RH. Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrial pathologies. *Journal of neuroscience research*. 2007;85(15):3416-28.

57. Cwerman-Thibault H, Augustin S, Lechauve C, Ayache J, Ellouze S, Sahel JA, et al. Nuclear expression of mitochondrial ND4 leads to the protein assembling in complex I and prevents optic atrophy and visual loss. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2015;2:15003.
58. Qi X, Sun L, Hauswirth WW, Lewin AS, Guy J. Use of mitochondrial antioxidant defenses for rescue of cells with a Leber hereditary optic neuropathy-causing mutation. *Archives of ophthalmology.* 2007;125(2):268-72.
59. Iyer S, Bergquist K, Young K, Gnaiger E, Rao RR, Bennett JP, Jr. Mitochondrial gene therapy improves respiration, biogenesis, and transcription in G11778A Leber's hereditary optic neuropathy and T8993G Leigh's syndrome cells. *Human gene therapy.* 2012;23(6):647-57.
60. Yu H, Koilkonda RD, Chou TH, Porciatti V, Ozdemir SS, Chiodo V, et al. Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(20):E1238-47.
61. Carelli V, La Morgia C and Sadun AA. Mitochondrial dysfunction in optic neuropathies: animal models and therapeutic options. *Curr Opin Neurol.* 2013; 26: 52-8.
62. Giordano C, Montopoli M, Perli E, et al. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain.* 2011; 134: 220-34.
63. Raxone® (idebenone). Assessment Report (EMA/480039/2015). London, UK: European Medicines Agency; 2015.
64. Kim SY, Shim MS, Kim KY, Weinreb RN, Wheeler LA and Ju WK. Inhibition of cyclophilin D by cyclosporin A promotes retinal ganglion cell survival by preventing mitochondrial alteration in ischemic injury. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1105.
65. Leruez S, Verny C, Bonneau D, et al. Cyclosporine A does not prevent second-eye involvement in Leber's hereditary optic neuropathy. *Orphanet J Rare Dis.* 2018; 13: 33.

ANEXO

(Instruções da Revista Sociedade Portuguesa de Oftalmologia para autores)

Instruções para Autores

INFORMAÇÃO GERAL

A revista da Sociedade Portuguesa de Oftalmologia é uma revista em open access que publica de forma prioritária artigos de investigação básica e clínica, como artigos de revisão, artigos originais, casos clínicos, relacionados com Oftalmologia nas suas diferentes especialidades, bem como temas de áreas de conhecimento fronteira com interesse para a prática médico-cirúrgica e processo clínico na perspectiva da governação clínica em Oftalmologia.

O rigor e a exatidão dos conteúdos, assim como as opiniões expressas são da exclusiva responsabilidade dos Autores.

PROCESSO EDITORIAL

1. **Condições gerais** – Os artigos devem ser preferencialmente redigidos em Português ou Inglês, sendo desejável que progressivamente sejam em Ing. Será dada sempre preferência de publicação aos artigos submetidos simultaneamente em Português e Inglês. Poderão ser publicados artigos numa outra língua (espanhol ou francês), sendo que estes tem de ser obrigatoriamente submetidos também em Inglês.

Os manuscritos depois de rececionados são encaminhados para o editor da revista, que fará uma primeira avaliação editorial com o fim de comprovar a sua adequação (no âmbito temático e de interesse para a revista) e o cumprimento dos requisitos de apresentação formal exigidos nas normas de publicação. Desta apreciação resulta a aceitação para revisão por pares ou a sua devolução ao autor para correção e nova submissão.

Os manuscritos devem ser submetidos em ficheiros de texto em formato Word (.DOC ou .DOCX), com texto seguido e sempre com o mesmo tipo de letra. Os textos devem ser formatados em letra “Arial”, tamanho 11 com espaçamento de 1,5 linhas. Os títulos e subtítulos deverão estar assinalados a negrito e em tamanho 12. A primeira página (página de rosto) deve conter somente os elementos descritos adiante na rubrica “Organização do Artigo”.

Os documentos submetidos para publicação serão propriedade da revista Oftalmologia da SPO transferindo os seus autores o direito de propriedade (copyright) a partir do momento que são aceites para publicação. Não serão aceites artigos simultaneamente submetidos noutras publicações científicas.

Os trabalhos devem ser submetidos em formato electrónico, na plataforma da revista da SPO, acessível a partir do site da SPO : <http://www.spoftalmologia.pt> ou da plataforma da revista “Oftalmologia” no serviço de alojamento de revistas científicas do Repositório Científico de Acesso Aberto de Portugal (RCAAP): revistas.rcaap.pt/index.php/oftalmologia .

2.– Uma vez aprovado pelo editor o manuscrito será enviado para revisão por parte de dois ou mais revisores, de forma confidencial e anónima. Os autores receberão a informação da avaliação dos revisores através do editor, sendo-lhes solicitadas as correções oportunas e consequente re-submissão. A seleção dos revisores realiza-se através do conselho redatorial da revista, tendo em conta os méritos académicos, científicos e experiência profissional, em cada uma das subespecialidades oftalmológicas, incluindo investigadores nacionais ou internacionais. Cada artigo será obrigatoriamente revisto por um membro do conselho redatorial e por um revisor externo ao mesmo.

3. **Política editorial** – a decisão do editor, após consultados os revisores, para aceitação-rejeição de um trabalho submetido baseia-se nos seguintes fatores:

I. **Originalidade:** assunto e/ou método original, com informação valiosa e apresentação de resultados novos ou confirmação de resultados já anteriormente verificados.

II. **Atualidade e/ou novidade** – tema que está na agenda das reuniões ou comunicações científicas ou é novo.

III. **Relevância** – aplicabilidade dos resultados para a resolução de problemas concretos da prática oftalmológica.

IV. **Inovação e significância** – avanço do conhecimento científico, técnico e/ou prática clínica.

V. **Fiabilidade e validade científica** – boa qualidade metodológica evidenciada.

VI. **Apresentação** – boa redação e organização do texto (boa coerência lógica e apresentação do material).

VII. **Prazo de resposta as revisões** – Todos os artigos que não tenham uma resposta às decisões editoriais num prazo de 6 meses serão automaticamente rejeitados pelo editor

SECÇÕES

1. **Editoriais e notas** - Os editoriais e notas editoriais serão ou encomendados pelo editor da revista a quem considere oportuno ou da sua responsabilidade.
2. **Cartas ao editor** - Esta secção pode incluir comentários sobre artigos previamente publicados ou comentários sobre outras matérias de interesse científico para oftalmologia. Esta correspondência estará sujeita ao processo de revisão pelos pares e será publicada na medida em que o espaço, as prioridades e interesse o permitam. Estas não devem ultrapassar as 500 palavras. As cartas ao editor que versem sobre artigos previamente publicados terão direito de resposta, preferencialmente no mesmo número.
3. **Artigos de revisão e “guidelines”** – O objetivo da secção é atualizar determinados temas de oftalmologia, discutir novos conceitos ou rever conceitos clássicos tendo em vista os novos avanços de diagnóstico e tratamento e a divulgação das boas práticas em oftalmologia. Serão solicitados pelo Editor / Conselho Redatorial a personalidades reconhecidas e ou grupos de trabalho. Para além das revisões por convite, os artigos de revisão podem ainda ser submetidos por autores com elevada experiência numa área de estudo da oftalmologia para serem submetidos ao processo editorial.
4. **Artigos originais** – Podem incluir-se tanto trabalhos experimentais como clínicos, sempre que se trate de trabalhos de investigação. Os trabalhos de investigação devem ser inéditos e não podem ter sido submetidos para publicação em outra revista estrangeira indexada. Incluem-se nesta rubrica os prémios atribuídos no âmbito da SPO.
5. **Comunicações curtas e casos clínicos** – Deverão ser manuscritos resumidos descrevendo inovações técnicas e tecnológicas, manobras cirúrgicas inovadoras, aspectos de outras áreas do conhecimento relacionados com a prática oftalmológica, bem como casos clínicos com informação de prática clínica relevante.
6. **Histórias da História da Oftalmologia Portuguesa** – Será uma rubrica curta realçando aspectos relacionados com personalidades ou acontecimentos da oftalmologia portuguesa.
7. **Flash-look**. Nesta rubrica agrupam-se artigos curtos de atualização em conceitos básicos da prática clínica de oftalmologia, como classificação, opções terapêuticas, manuais de procedimentos de determinadas patologias.

ORGANIZAÇÃO DO ARTIGO

Os artigos devem ser submetidos em formato bilíngue (sendo que a segunda língua do manuscrito deve ser o Inglês), ou somente em Inglês.

1. **Página do título/identificação** – (página separada) Contendo título do artigo, nome (s) dos (s) autor (es), serviço (s) hospitalar (es) e departamentos ou organismos onde foi realizada a investigação, títulos académicos e/ou hospitalares dos autores. Nesta página deve ainda figurar o endereço postal completo para envio de correspondência e o endereço eletrónico do autor correspondente. Se o trabalho já tiver sido apresentado, indicar onde e em que data bem como a referência a prémio obtido. Os autores deverão manifestar a existência de conflito de interesse (nomeadamente comercial no produto, equipamento ou processo), certificar que o trabalho não foi publicado previamente e que cedem os direitos de autor à SPO.
2. **Resumo** – Em Português e em Inglês com o máximo 250 palavras. O resumo deve ser subdividido em: Objetivos, Material e Métodos, Resultados, Conclusões.
3. **Palavras chave** – Duas listas de cinco palavras chave, em Português e Inglês, que resumam e classifiquem os principais assuntos focados no texto: estas destinam-se a codificação no índice.
4. **Texto** – Recomenda-se que o texto tenha as seguintes secções separadas: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão; poderá ser necessário fazer adaptações a circunstâncias particulares, como no caso dos casos clínicos ou dos artigos de “flash look”. O autor deverá indicar no texto, em local apropriado, em numeração árabe e em “superscript”, as citações bibliográficas que fizer. É da exclusiva responsabilidade do autor a verificação da exatidão das referências bibliográficas e da sua colocação no texto.
5. **Agradecimentos** – Tanto a pessoas, como a entidades, quando tal for justificado.
6. **Declaração de interesses financeiros**
7. **Bibliografia** – De modo geral segue-se o sistema de Vancouver, com a diferença principal de que a lista das referências bibliográficas deve ser alfabética e subsequentemente numerada. Se houver mais de uma referência do mesmo autor, serão indicadas em primeiro lugar aquelas em que o autor aparece isolado e só depois aquelas em que há mais que um autor.
8. **Quadros, tabelas e figuras** – são enviados em formato eletrónico, em ficheiros separados do texto. Os quadros e tabelas podem ser feitos num processador de texto ou numa

folha de calculo (em Excel). As figuras devem ser feitos formato editável tipo “TIF”, um ficheiro para cada imagem com qualidade de impressão (≥ 300 dpi). As figuras quadros e tabelas devem ser referenciadas no texto e deve ser indicado a zona do texto às quais ficarão adstritas após formatação do artigo.

9. Legendas das figuras. As figuras devem ser obrigatoriamente legendadas e as legendas enviadas nesta secção. Os quadros e tabelas não devem ter legendas.

10. Abreviaturas e símbolos – Só devem ser usadas abreviaturas de uso corrente. Se for imprescindível recorrer a abreviaturas menos usuais, na primeira vez em que o termo aparece no texto ele deve figurar por extenso, logo seguido pela abreviatura entre parêntesis.