

**M**

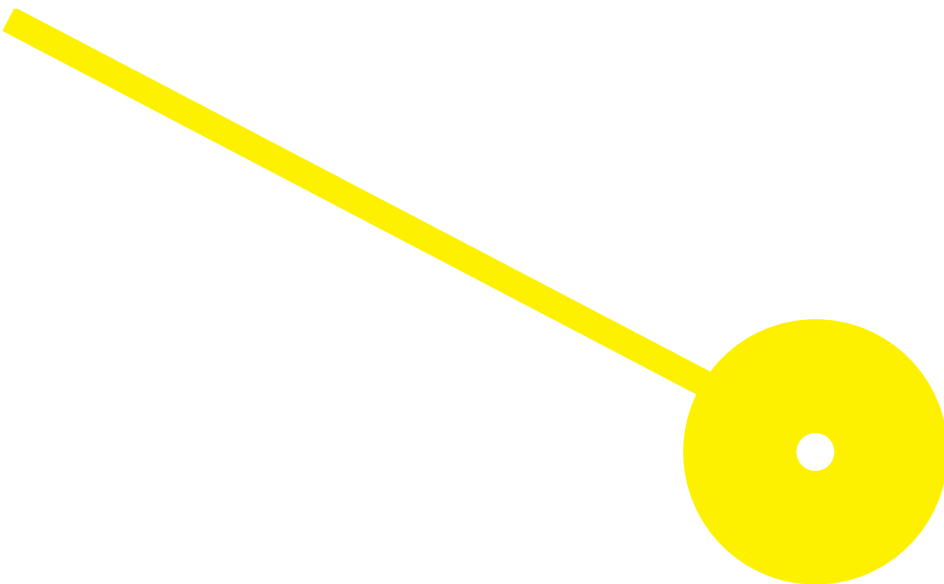
MESTRADO

Técnicas Laboratoriais em biopatologia: patologia molecular

# Retinopatias hereditárias e sequenciação de ORF15 do gene *RPGR*

Petra Takács

06/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



## **Retinopatias hereditárias e sequenciação de ORF15 do gene *RPGR***

**Autor**

Petra Takács

**Orientadores**

Alexandra Filipa Branco Lopes, Coordenadora do Laboratório de sequenciação, Laboratório de Genética Unilabs

Prof Doutor Hugo Rocha, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto

Prof Doutora Regina A Silva, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto

**Projeto de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia** – Ramo de Especialização em **Patologia molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer à Unilabs, onde realizei o meu estágio, por proporcionar uma experiência de aprendizagem e um ambiente de apoio para realizar a minha tese. Estou verdadeiramente grata pela oportunidade de trabalhar ao lado de profissionais dedicados, dando um especial destaque à Alexandra Lopes, orientadora deste projeto, pela oportunidade de trabalhar no projeto e pela sua orientação que tem sido fundamental na moldagem deste trabalho.

A minha apreciação estende-se a toda a equipa da Unilabs, cujas contribuições diretas e indiretas foram fundamentais para a execução deste projeto. Estou, particularmente, grata pelo apoio e orientação da Cátia Nunes e da Catarina, que desempenharam um papel crucial na concretização bem-sucedida do projeto.

Agradeço ainda pelo apoio dos professores, cuja orientação e mentoria foram indispensáveis ao longo de toda a jornada de desenvolvimento da tese.

Ainda gostaria de mencionar a minha querida família, cujo amor, crença nas minhas capacidades e apoio, têm sido os pilares da minha força e motivação para superar os meus limites.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos, cuja camaradagem tem sido uma fonte inesgotável de inspiração, em particular agradecer à Melany, Ana e Julieta, minhas colegas do mestrado, que estiveram presentes em todos os momentos, compartilhando não apenas os desafios, mas também as alegrias destes dois anos.

## **Resumo**

Retinopatias hereditárias têm uma prevalência de 1:1380 indivíduos, sendo que a retinite pigmentosa é a mais comum, com mais de 50 genes envolvidos. A forma mais severa é a ligada ao X, que corresponde a 5-15 % dos casos de retinite pigmentosa e o gene RPGR está associado a 70-80 % destes casos. O ORF15 é uma região altamente repetitiva no gene RPGR, de baixa complexidade e rica em purinas que excede 1Kb de tamanho, tornando-o difícil de sequenciar, seja por Sanger ou NGS.

Dada esta dificuldade, o objetivo deste projeto foi desenhar novos primers para sequenciar esta região utilizando NGS multiplex, por meio de enriquecimento baseado em amplicões (amplicon based enrichment) e definição de condições de PCR específicos.

Foi ainda realizada uma compilação dos testes previamente executados pelo laboratório de retinopatias, para realizar uma análise descritiva e selecionar casos potencialmente relacionados com ORF15 do gene RPGR, para serem alvos de sequenciação.

O laboratório conseguiu sequenciar esta região com sucesso, obtendo uma cobertura média de 1196 leituras, permitindo assim, implementá-la no laboratório e oferecer uma testagem mais ampla aos clientes, contribuindo para melhorar as capacidades diagnósticas para estas doenças.

**Palavras-chave:** retinopatias hereditárias, retinite pigmentosa, doenças hereditárias da retina, NGS (Next-Generation Sequencing), ORF15, RPGR.

## **Abstract**

Hereditary retinopathies have a prevalence of 1:1380 individuals, with retinitis pigmentosa being the most common, involving more than 50 genes. The most severe form are X-linked, accounting for 5–15 % of retinitis pigmentosa cases, and the RPGR gene is associated with 70–80 % of these cases. The ORF15 region is a highly repetitive, low-complexity, purine-rich region in the RPGR gene that exceeds 1 kb in size, making it challenging to sequence both by Sanger sequencing and NGS.

Given this difficulty, the objective of this project was to design new primers to sequence this region using multiplex NGS, through amplicon-based enrichment and by defining specific PCR conditions. A compilation of previously conducted tests by the laboratory was also performed to carry out a descriptive analysis and select cases potentially related to ORF15 of RPGR for sequencing.

The laboratory successfully sequenced this region, achieving an average coverage of 1196 reads. This success allows for the implementation of ORF15 sequencing in the laboratory, offering broader testing to clients and contributing to improved diagnostic capabilities for this group of diseases.

**Keywords:** Hereditary retinopathies, retinitis pigmentosa, inherited retinal diseases, NGS (Next-Generation Sequencing), ORF15, RPGR.

## Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Retinopatias Hereditárias.....	1
1.1.1	Caracterização clínica.....	2
1.1.2	Testes/ diagnóstico clínico.....	3
1.2	Retinite pigmentosa.....	4
1.3	Outras retinopatias hereditárias.....	6
1.4	Fotorreceptores.....	7
1.4.1	Transporte até ao cílio de conexão.....	9
1.4.2	Transporte através do cílio de conexão.....	10
1.5	RPGR e a sua função.....	11
1.5.1	Variações fenótipo-genótipo de variantes no RPGR.....	12
1.6	Otimização da sequenciação ORF15 do gene RPGR.....	14
2	Métodos.....	17
2.1	Compilação da base de dados.....	17
2.2	Desenho de primers ORF15 e escolha do programa de amplificação.....	17
2.3	Amostragem para testar os primers.....	19
2.4	Ensaio de NGS.....	20
2.4.1	Extração de ADN.....	20
2.4.2	Amplificação.....	20
2.4.3	Eletroforese em gel de Agarose.....	21
2.4.4	Purificação dos produtos de amplificação.....	21
2.4.5	Quantificação e diluição dos amplicões purificados.....	21
2.4.6	Fragmentação e Tagmentação.....	22
2.4.7	Purificação dos produtos de Tagmentação.....	22
2.4.8	Ligação de sequências identificadoras de amostra (indexes) para NGS por PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	22
2.4.9	Purificação dos produtos de amplificação.....	23
2.4.10	Avaliação e pooling das bibliotecas.....	23
2.4.11	Sequenciação NGS.....	23
2.4.12	Controlo de qualidade e classificação de variantes.....	24
3	Resultados.....	26

3.1	Compilação dos resultados dos painéis e sua análise descritiva.....	26
3.1.1	Caracterização fenotípica dos genes mais mutados .....	28
3.2	Validação dos novos primers desenhados com amostras normais.....	29
3.3	Variante encontrada das amostras de Sanger e dos Painéis .....	31
4	Discussão.....	34
5	Conclusão.....	38
	Referências Bibliográficas.....	39
	Anexos.....	46

## Lista de abreviaturas

- ABCA4- ATP binding cassette subfamily A member 4
- ACMG- American College of Medical Genetics and Genomics
- ADN- Ácido desoxirribonucleico
- AF- Autofluorescência do Fundo ocular
- ARN- Ácido ribonucleico
- ARF4- ADP Ribosylation Factor 4
- ASAP1- ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1.
- ATE- Buffer de eluição
- B- Benigno
- BA1- Benign Standalone (critério da ACMG, para classificação de variantes)
- BAM- Binary Alignment Map
- BBS4- Bardet-Biedl syndrome 4
- BBSome- Bardet Biedl syndrome protein complex
- BED- Browser Extensible Data
- CC- Cílio Conector
- CEP290- Centrosomal protein 290
- CRB1- homólogo do gene "crumbs" 1
- CTIL- Cisteína, Treonina, Isoleucina, Leucina
- DEPC- Diethylpyrocarbonate
- EYS- gene homólogo do gene "eyes shut" (mosca das frutas)
- FIP3- FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 3
- GAP- GTPase Activating Protein
- GBF1- Golgi specific Brefeldin A-resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
- GDP- Guanosina difosfato
- GTP- Guanosine triphosphate
- GTPase- guanosine triphosphatase
- HPLC- High Performance Liquid Chromatography
- IFT- Intraflagellar transport
- IFT-B- IFT protein complex B
- IFT-A- IFT protein complex A
- IQCB1- IQ calmodulin-binding motif-containing protein 1

Kb- Mil bases  
mARN- Mensageiro de ácido ribonucleico  
MIM- Mendelian Inheritance in Man (database)  
MVL- Managed Variant List  
ncRNA- Non-coding RNA  
NGS- Next Generation Sequencing  
NPHP- Nephronophthisis  
ORF15- Open Reading Frame 15  
pb- Pares de base  
PB- Provavelmente Benigno  
PCM1- Pericentriolar Material 1  
PCR- Polymerase chain reaction  
PDE6D- Phosphodiesterase 6 delta  
%PF- Passing Filter  
PMS2- Postmeiotic segregation increased 2  
PM2- Pathogenic Moderate 2 (critério da ACMG, para classificação de variantes)  
PP5- Pathogenic Supporting (critério da ACMG, para classificação de variantes)  
PVS1- Pathogenic Very strong 1 (critério da ACMG, para classificação de variantes)  
%Q30- Quality reads with quality score 30 or higher  
QC- Quality Control  
RAB11- Ras related protein 11  
RCC1- Regulador de condensação cromossómica  
RLD- RCC1 like domain  
RPGR- Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator  
RPGRIP1- Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1  
RPGRIP1L- Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 like  
RSB- Resuspension buffer  
SEC15- proteína SEC15 da via secretória  
SMC1- Structural maintenance of chromosomes 1  
SNAP25- Synaptosomal- associated protein 25  
SNARE- Soluble NSF Attachment Protein Receptor  
SNP- Single Nucleotide Polymorphisms

TCO- Tomografia de Coerência Ótica  
TCTEX-1- T complex associates testis expressed 1  
TTLL5- Tubulin tyrosine ligase-like 5  
USH2A- gene da síndrome de Usher tipo 2A  
VAMP7- Vesicle-Associated Membrane Protein 7  
VCF- Variant Call Format  
VUS- Variant of Uncertain Significance  
VxPx- Valina, aminoácido, prolina, aminoácido  
WES- Whole exome sequencing  
UCSC- University of California, Santa Cruz (genome browser)  
USH2A- Usher syndrome type 2 A  
UTR- Untranslated region

## 1 Introdução

### 1.1 Retinopatias Hereditárias

As retinopatias hereditárias são um grupo de doenças heterogêneas que afetam a retina e levam à perda de visão ou mesmo cegueira [1]. Este grupo de doenças apresenta uma prevalência de 1:1380 indivíduos, sendo a retinite pigmentosa (distrofia de bastonete-cones) a mais comum [2]. Existem outras doenças como degeneração do cone, degeneração cone-bastonete, doença de Leber, distrofia macular, entre outras. Desde 1990, vários genes, provavelmente implicados na doença foram mapeados e estudados, o que levou ao aumento exponencial do número de genes identificados associados às retinopatias, chegando agora a um plateau, com mais de 277 genes identificados até 2021 (Figura 1) [2,3].

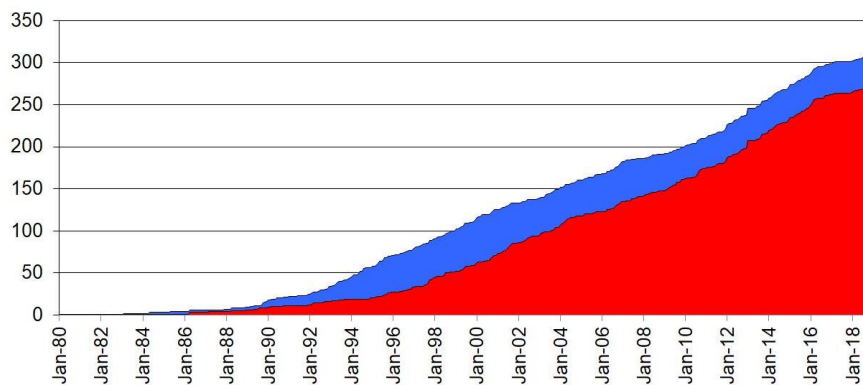


Figura 1- Número de genes mapeados e identificados nas retinopatias hereditárias ao longo dos anos; azul- genes mapeados; vermelho- genes identificados; Jan- janeiro; Fonte:retirado de RetNet -Retinal Information Network ([uth.edu](http://uth.edu))

Num artigo titulado de "Inherited retinal diseases: Linking genes, disease causing variants, and relevant therapeutic modalities" (Nina Schneider et.al, 2022) [3], foi realizado uma revisão sistemática onde foi compilado um conjunto de dados mundiais de doenças hereditárias da retina, tendo sido reportados 194 genes e identificadas 4798 variantes (de 31 artigos). Este artigo identificou *ABCA4*, *USH2A*, *EYS*, *RPGR* e *CRB1* como os genes associados a retinopatias hereditárias mais comuns no mundo, sendo 50 % das retinopatias hereditárias causadas por mutações nestes genes. Além disso, 58 % de genes associados a este grupo de doenças, estão mutados em menos de 0,1% dos indivíduos afetados (Figura 2).

Para acrescentar, existe uma grande proporção de variantes patogénicas privadas (65 %), o que pode dificultar a deteção e classificação de variantes nos testes genéticos [3].

Em genes autossômicos dominantes, para além de variantes *null* que causam doença devido à haploinsuficiência, também existem variantes missense (como nos genes, *RHO*, *BEST* e *KHLH7*), que causam doença através do mecanismo dominante negativo (onde existe uma interação negativa com a proteína selvagem/*wild type*) ou através do ganho de função. Variantes nonsense também podem ser recessivas, o que pode ser explicado pela degradação de ARN mensageiro, mediada por mutação *nonense*, em casos de haploinsuficiência (onde apenas metade da proteína selvagem (*wild type*) é suficiente para prevenir sintomas da doença) [3].

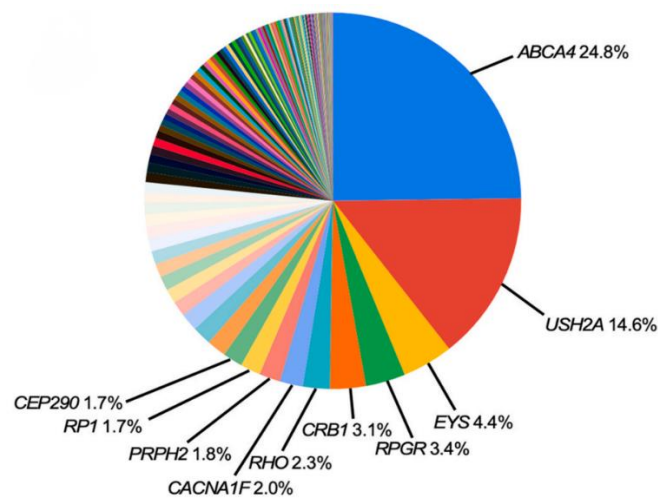


Figura 2- Distribuição dos genes associados às retinopatias hereditárias global. Fonte: retirado de Schneider, Nina et al., 2022, <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.101029>

### 1.1.1 Caracterização clínica

Dado o grande número de genes associadas às retinopatias, estas podem ter um padrão de transmissão autossômica dominante, recessiva, ligada ao X ou mitocondrial. Existem situações onde um gene pode estar associado tanto a um padrão de transmissão recessivo como dominante. Quanto a doenças ligadas ao X, estas também podem ser semi-dominantes, onde o género feminino em heterozigotia pode apresentar sintomas moderados ou mesmo até completos (como em *RPGR*). Esta apresentação clínica pode depender do padrão de inativação do cromossoma X [4,5].

Além disso, alguns genes podem estar associados a uma síndrome, podendo afetar outros órgãos, como a síndrome de Usher que está associada à surdez neuro-sensorial [1,3].

Por fim, as retinopatias hereditárias são um grupo de doenças difíceis de caracterizar fenotipicamente e efetuar um diagnóstico apenas pela apresentação clínica. Isto porque, existem

genes que estão associados a várias patologias, patologias que estão associados a vários genes, genes que não provocam doença, mas que modelam a sua severidade, mutações no mesmo gene que levam a um fenótipo diferente e mutações familiares com fenótipo variável. Esta grande variabilidade causa assim uma sobreposição da apresentação clínica entre doenças [1,3,6,7].

Quando a doença afeta predominantemente os bastonetes, o indivíduo apresentará um sintoma inicial de perda de visão noturna (visão em alturas de baixa intensidade de luz e dificuldade na adaptação de luz intensa para fraca), enquanto, quando os cones são os mais lesionados, irá afetar a nitidez visual, percepção de cor, aversão à luz e nistagmo (movimento rápido involuntário do olho). No caso de doenças progressivas, são normalmente de início precoce e a severidade dos sintomas aumenta ao longo do tempo, podendo haver aparecimento de sintomas adicionais como constrição do campo visual, alterações pigmentares, atenuação dos vasos sanguíneos da retina e palidez dos discos óticos [3,8].

### **1.1.2 Testes/ diagnóstico clínico**

Para realizar o diagnóstico destas doenças, é importante obter informações sobre a história ocular do doente, idade de início, história clínica geral para identificar síndromes que podem afetar a retina (como na síndrome de Usher), história familiar e de consanguinidade (idealmente, com *pedigree* de três gerações) o que facilita a percepção do tipo de hereditariedade, deve realizar-se um exame clínico, como a função visual do paciente e por fim, realizar testes genéticos [1,7].

A história da toma de medicamentos também pode ser informativa para diferenciar retinopatias causadas por certas drogas como hidroxicloroquina, polissulfato de pentosano ou por terapias com imunomoduladores, que podem ter efeitos adversos oculares [7]. Fatores dietéticos e de estilo de vida também devem ser considerados como, por exemplo, a vitamina A que é um fator de risco para a progressão de doenças causadas por variantes em *ABCA4* (variantes afetam o transporte da vitamina, causando a sua acumulação, consequente toxicidade e morte celular) ou quando pacientes com retinite pigmentosa fumam [7,9].

Os exames clínicos incluem estudos para avaliar a estrutura da retina e a sua função visual. A retina pode ser visualizada através de autofluorescência do fundo ocular (AF) e tomografia de coerência ótica (TCO) [7,8]. A AF permite visualizar a distribuição de fluoróforos do fundo ocular, dando informação sobre a distribuição e extensão da doença retiniana, permitindo avaliar a acuidade ocular. A TCO permite a avaliação da espessura das camadas externas (fotorreceptores)

e a deteção de alterações internas, como, por exemplo, a identificação de edema ou buraco macular, perdas focais pequenas e a avaliação da integridade do epitélio pigmentar da retina [7,8]. Quanto aos testes eletrofisiológicos, a função da retina pode ser avaliada através de eletrorretinografia de campo total que consegue identificar alterações externas e internas, principalmente da retina periférica, facto que ajuda a determinar e a quantificar a função dos fotorreceptores e a diferenciar entre bastonetes e cones [1,3]. Para a avaliação da função da mácula, é usado eletrorretinografia padrão ou multifocal [1,3].

Existem também testes psicofísicos que ajudam a caracterizar a função visual e retiniana. Estes incluem avaliação da acuidade visual, usando o gráfico de Snellen em adultos e os símbolos Lea ou os Landoltrings em crianças na idade pré-escolar, teste de visão de cores, adaptómetria ao escuro, bem como sensibilidade ao contraste e várias formas de luz, como o gráfico de Pelli-Robson ou o teste Melbourne Edge [1,3,7,8].

Pacientes com apresentação clínica de retinopatias hereditárias devem ser encaminhados para um centro multidisciplinar especializado nestas doenças para avaliação, aconselhamento genético e testes genéticos. Um diagnóstico genético auxilia na determinação do subtipo de retinopatias diante de múltiplos diagnósticos clínicos, permite avaliar a segregação, isto é, perceber se duas variantes recessivas estão em trans ou cis, esclarecer o risco para outros membros da família e facilitar no desenvolvimento de tratamentos específicos direcionados para o gene causador de doença [1,3,8,10,11].

## **1.2 Retinite pigmentosa**

A retinite pigmentosa é a doença hereditária da retina mais comum, apresentando uma prevalência aproximadamente de 1:4000, sendo alguns dos casos sindrómicos (como síndrome de Usher, Joubert e Bardet Biedl) [8,10]. Mais de 50 genes estão envolvidos (Tabela 1), podendo estas doenças ter um modo de transmissão autossómica dominante, recessiva, ligadas ao X ou mitocondriais (casos raros onde dois genes estão mutados), sendo a forma mais severa a ligada ao X, que corresponde a 5-15 % dos casos de retinite pigmentosa, com as variantes mais comuns no gene *RPGR* (70-80 %) [8,12,13,14].

Tabela 1- Genes identificados associados à retinite pigmentosa e modo de transmissão.

Modo de transmissão	Genes associados
Autossômico dominante	<i>ADIPOR1, ARL3, BEST1, CA4, CRX, FSCN2, GUCA1B, HK1, IMPDH1, IMPG1, KIF3B, KLHL7, NR2E3, NRL, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PRPH2, RDH12, RHO, ROM1, RP1, RP9, RPE65, SAG, SEMA4A, SNRNP200, SPP2, TOPORS</i>
Autossômico recessivo	<i>ABCA4, AGBL5, AHR, ARHGEF18, ARL6, ARL2BP, BBS1, BBS2, BEST1, C8orf37, CERKL, CLCC1, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CRB1, CWC27, CYP4V2, DHDDS, DHX38, EMC1, ENSA, EYS, FAM161A, GPR125, HGSNAT, IDH3B, IFT140, IFT172, IMPG2, KIAA1549, KIZ, LRAT, MAK, MERTK, MVK, NEK2, NEUROD1, NR2E3, NRL, PCARE, PDE6A, PDE6B, PDE6G, POMGNT1, PRCD, PROM1, PROS1, RBP3, REEP6, RGR, RHO, RLBP1, RP1, RP1L1, RPE65, SAG, SAMD11, SLC7A14, SPATA7, TRNT1, TTC8, TULP1, USH2A, ZNF408, ZNF513</i>
Ligado ao X	<i>OFD1, RP2, RPGR</i>

Fonte retirado de RetNet -Retinal Information Network ([uth.edu](http://uth.edu))

A retinite pigmentosa surge principalmente na adolescência e nos inícios da idade adulta onde a idade de início e a progressão da doença varia segundo o tipo de modo de transmissão (Tabela 2). A retinite pigmentosa é caracterizada pela perda precoce de fotorreceptores, principalmente bastonetes, estreitamento das arteríolas na retina e atrofia do epitélio pigmentar da retina [7,8,12,14].

A progressão da doença leva à constrição do campo visual, degeneração dos cones, que estão situados principalmente na mácula central, podendo estar acompanhada por edema cistóide macular (principalmente bilateral e em indivíduos novos) ou catarata subcapsular posterior. Além disso, com a progressão, as células pigmentares epiteliais da retina descolam-se da membrana de Bruch (camada interna da coróide) e migram para zonas intra retinianas levando à acumulação de melanina (pigmentos), formando “espículas ósseas”, que aparecem na periferia onde os bastonetes são mais numerosos. Para acrescentar, também existem alterações secundárias como a desorganização das camadas externas da retina, atenuação severa de vasos e palidez serosa do nervo ótico [7,8,12,14].

As características clínicas incluem cegueira noturna (nictalopia), com diminuição da sensibilidade ao contraste de luz (visão turva) e perda do campo visual periférico inicial, constrição do campo visual na sua progressão, podendo levar, eventualmente, a discromatopsia ao azul e amarelo, fotopsia, miopia e cegueira completa [7,8,12,14].

Tabela 2- Genes mais comuns associados à retinite pigmentosa e caracterização clínica geral, segundo o tipo de hereditariedade.

Modo de transmissão	Genes com mutações mais comuns	Caracterização clínica geral
Autossômico Dominante	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RHO (20-30 %)</li> <li>• RP1 (5-10 %)</li> <li>• RDS (5-10 %)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forma menos severa</li> <li>• Início de idade adulta</li> <li>• Prograssão lenta</li> <li>• Retenção da acuidade visual central até estágio muito avançado</li> </ul>
Autossômico Recessivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ABCA4 (5 %)</li> <li>• RPE65 (2 %)</li> <li>• USH2A (20 %, 70 % sindrômicos)</li> <li>• PDE6A (5 %)</li> <li>• PFE6B (5%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Severidade moderada</li> <li>• Início na infância ou início da adolescência</li> <li>• Progressão de velocidade variada</li> <li>• Acuidade visual central reduzida</li> </ul>
Ligado ao X	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RPGR (70-80 %)</li> <li>• RP2 (10-20 %)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forma mais severa</li> <li>• Início na infância em homens</li> <li>• Progressão rápida</li> <li>• Pouca acuidade visual central</li> </ul>

Fonte: Adaptado de O'Hare, Fleur et al. 2021, <https://doi.org/10.1080/08164622.2021.1878851>.

A retinite pigmentosa ligada ao X é a forma mais severa da doença, apresentando início numa idade mais precoce em homens e uma progressão mais acelerada. Os principais genes associados são *RPGR* e *RP2* (Tabela 2), sendo estes também os genes em que as mulheres portadoras podem apresentar fenótipo, de severidade variada, várias vezes, com assimetria entre os dois olhos, baixa acuidade visual, problemas na adaptação ao escuro, restrição do campo visual e também podem apresentar reflexo tapetal no *fundus* ou mesmo retinopatia pigmentar [8,15].

Mutações em *RPGR* fazem parte de, pelo menos, 15 % de casos de retinite pigmentosa esporádicos em homens (em casos isolados) e para além disto, dentro das retinites pigmentosas causadas pelas mutações em *RPGR*, 70 % apresentam mutações em ORF15 [16].

### 1.3 Outras retinopatias hereditárias

Enquanto a retinite pigmentosa é uma das retinopatias mais comuns, existem outras retinopatias hereditárias que afetam a retina de uma forma distinta [2].

A Amaurose congénita de Leber corresponde a uma disfunção generalizada dos cones e bastonetes, tem como modo de transmissão geralmente autossómico recessivo, com início congénito ou nos primeiros anos de vida, com perda de visão rápida e severa, acompanhado por nistagmos, fotofobia e hiperopia [8,10,17]. É uma doença geneticamente heterogénea, com vários genes associados como *GUCY2D*, *CEP290*, *RPE65* e *AIPL1* [13].

A Coroideremia é uma doença ligada ao X, causada por mutações no gene *CHM*, com início no fim da infância e início da adolescência, afeta principalmente o epitélio pigmentar da retina, com início na periferia que progride para a zona central, e com nictalopia. A Doença na fase avançada apresenta perda da acuidade visual central, afinamento e perda coriorretiniana (esclera visível) com áreas brancas-pálidas irregulares [8,10,17].

A Distrofia de cones-bastonetes corresponde a um grupo de doenças normalmente com início precoce e, por vezes, sindrómico, caracterizadas por degeneração macular primária (cones) e alterações atróficas centrais na retina externa, acompanhada por fotofobia e distúrbios na visão da cor, progressão periférica, degenerando bastonetes e difícil adaptação ao escuro [7,13,17]. O gene mais comum associado às doenças autossómicas dominantes é o *ABCA4*, os genes associados a doenças autossómicas dominantes são, por exemplo, *GUCA1A*, *GUCY2D* e *PRPH2*, por fim o principal gene associado a casos ligados ao X é o *RPGR* [13].

A acromatopsia (distrofia dos cones) é autossómica recessiva e estacionária, com início congénito ou infantil e os genes principais associados são o *CNGB3* e *CNGA3*. Os indivíduos que padecem desta doença, apresentam nistagmos, fotofobia, redução da visão central e acuidade visual e perda de percepção de cores [10, 13].

#### **1.4 Fotorreceptores**

A retina humana tem dois tipos de fotorreceptores: cones, em que o segmento externo deste apresenta uma forma cónica, com três subtipos responsável pela visão a cores, e bastonetes, em que o segmento externo apresenta uma forma cilíndrica, geralmente mais estreitos e longos, responsáveis pela visão monocromática adaptada ao escuro [18,19].

A fóvea, zona responsável pela visão central, é constituída estritamente por cones, empacotados em alta densidade, tornando esta região de alta resolução. Quanto à visão periférica, à medida que se transaciona para a região periférica, a densidade dos cones vai diminuindo enquanto a densidade dos bastonetes vai aumentando, o que torna esta região mais sensível à luz [18].

Os fotorreceptores estão divididos em compartimentos. O segmento externo dos mesmos é composto por discos (em bastonetes) ou dobras lamelares (em cones) e contém proteínas para a cascata de fototransdução, como por exemplo, rodopsina, transducina, arrestina, ácidos gordos e fosfolípidos [20]. O segmento interno contém o núcleo e os microtúbulos. Alguns microtúbulos estendem-se a partir do corpo basal, composto pelo centríolo mãe e centríolo filho, até ao terminal pré-sináptico. Além disso, outros microtúbulos, neste caso o axonema, estendem-se a partir do centríolo mãe até ao segmento externo dos fotorreceptores e formam o cílio conector (CC), também denominado por zona de transição (Figura 3). Como o segmento externo do fotorreceptor não tem a capacidade de produzir as proteínas necessárias para a fototransdução, depende assim do segmento interno e do CC que têm um papel no transporte de proteínas e agem como barreira seletiva para regular a entrada e saída de proteínas [20,21,22,23].

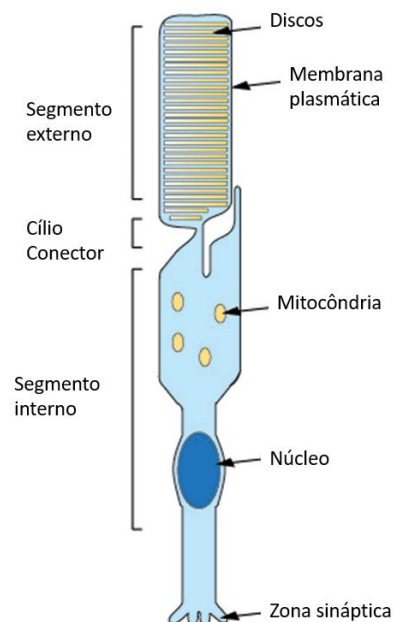


Figura 3- Estrutura do fotorreceptor do tipo bastonete. Fonte: retirada e adaptada de Megaw, Roly D et al, 2015, <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.007>.

As ligações em formato Y correspondem à estrutura única de microtúbulos duplos que se conectam à volta da membrana da base periciliar e estendem-se ao longo do CC. Existem várias teorias acerca da sua função, como estabilização da estrutura CC, servir como barreira entre o segmento exterior e interior, servindo como filtro ou auxiliar no transporte de proteínas [22].

A membrana periciliar encontra-se adjacente ao CC e serve para formar uma dobra interna na base do cílio, contendo proteínas específicas que permite a ancoragem de, por exemplo, vesículas transportadoras de rodopsina [22].

O segmento externo está em contacto com as células epiteliais pigmentares da retina, que participam na reciclagem do retinol (parte do ciclo visual) e na fagocitose de discos envelhecidos

da zona apical do segmento exterior, que ajuda na renovação e troca de discos que ocorre diariamente nos fotorreceptores [22]. A formação do disco na base do segmento externo implica que os discos mais novos empurrem os discos mais velhos apicalmente, onde são eventualmente eliminados e engolfados por estas células epiteliais da retina [21].

#### **1.4.1 Transporte até ao cílio de conexão**

As vias de transporte de proteínas solúveis e proteínas transmembranares até ao cílio de conexão, não estão completamente estudadas, no entanto, existem algumas proteínas e mecanismos já identificados para o mesmo.

Uma das vias de transporte possíveis envolve vesículas transportadoras, onde no complexo de Golgi, *ARF4*, um pequeno GTPase que regula a ligação das vesículas transportadoras de proteínas transmembranares, ao ser ativado pelo fator de troca de guanina *GBF1*, liga-se ao padrão VxPx (situado no terminal C citoplasmático) da rodopsina. A GAP, do *ARF4*, o *ASAP1*, oferece uma estrutura de ligação permitindo que *ARF4*-rodopsina se ligue a *RAB11a* (pequeno GTPase) e *FIP3* (efetor de *RAB11* e *ARF*) formando o complexo *RAB11-ARF4-ASAP1-FIP3*, o que leva à hidrólise do GTP em *ARF4*, dissociando a vesícula transportadora, do complexo de Golgi [21,23,24,25,26,27].

Pensa-se que o transporte, ao longo dos microtúbulos, da rodopsina em vesículas transportadoras do Golgi, para a base do cílio, requer *Tctex-1* (cadeia leve da dineína), que conecta as vesículas transportadoras aos motores, e requer *IFT20 (IFT-B)*, que serve como adaptador que se liga à rodopsina e outros IFTs na base do CC [25,28]. Além disso, durante o transporte até à base do cílio, *ASAP1* recruta *RAB8-GDP* e *Rabin8* (fator de troca de guanina) ao complexo [23,25,28].

As proteínas anteriormente referidas, asseguram o transporte da vesícula até ao local alvo, dado à sua interação com proteínas localizadas perto da membrana periciliar. *RAB11* ativa *Rabin8* que é recrutado para a vesícula secretora que se está a formar e que, conseqüentemente, ativa *RAB8*. O complexo *RAB11-rabin8-RAB8* recruta complexos exocíticos (como *SEC15*), *SNARE* e *VAMP7*, tornando a vesícula preparada para fusão com a membrana plasmática perto da base do CC (que contém proteínas que se ligam a *SNARE* como *syntaxina 3* e *SNAP25*) e assim, entregando as proteínas membranares ao seu destino [23,24,25,26,28].

Além disso, outros componentes podem ser necessários como satélites centriolares, como por exemplo, o complexo *BBSome* (neste caso *BBS4*), que se associa à *Rabin8*, proteínas ciliares

como o *RPGR* (que também ativa *RAB8*) e a complexos proteicos de transporte Intra flagelar [21,23,27].

#### **1.4.2 Transporte através do cílio de conexão**

O transporte de proteínas solúveis e membranares, através do CC até ao segmento externo dos fotoreceptores, envolve uma combinação de transporte ativo e difusão passiva com mecanismo de filtragem.

No transporte ativo, as vesículas transportadoras fundem-se com a membrana periciliar, libertando a carga no segmento interno apical e depois entram no CC e são transportados por complexos proteicos de transporte Intra flagelar (IFT) para os discos nascentes, passando assim a barreira de difusão membranares para entrar nos cílios. O movimento anterógrado das proteínas sintetizadas para o segmento exterior depende de complexo *IFT-B* e cinesinas, enquanto o movimento retrógrado, para reciclagem e renovação de proteínas, depende de complexo *IFT-A* e dineínas. O complexo *BBSome* age como adaptador para o *IFT-B*, controla o movimento para e dentro do cílio, bem como fora deste, contribuindo para a remoção de proteínas indesejadas [21,22,23,25].

Uma outra hipótese de transporte corresponde à da difusão ao longo da membrana ciliar, independentemente dos IFTs. Neste caso, após o transporte das proteínas para a membrana periciliar por vesículas de transporte e sua libertação para a membrana plasmática, as proteínas destinadas a permanecer na membrana plasmática do segmento interno simplesmente se difundem aleatoriamente até a uniformidade e as proteínas destinadas ao segmento externo se difundem até encontrarem o complexo *BBSome* ou algum outro porteiro na base do cílio de conexão e depois voltam a difundir-se em direção aos parceiros de ligação que determinam sua localização no segmento externo. No caso da rodopsina, este liga-se a ele mesmo, onde domínios extracelulares em uma membrana de disco recém-formada interagem com domínios extracelulares membrana do disco formado previamente, mantendo as membranas juntas como velcro estocástico [23].

Por outro lado, as proteínas solúveis evitam completamente o ponto de verificação no cílio de conexão. Estes movimentam-se livremente e preenchem os espaços citoplasmáticos, equilibrando a concentração de forma uniforme em todos os lugares, sendo que a concentração é ditada pelo tamanho destes e pelo tamanho dos espaços em que entram [23].

## 1.5 RPGR e a sua função

Na retina, *RPGR* encontra-se perto do CC e corpos basais, e tem como função a manutenção de fotorreceptores maduros, facilitando a seleção e transporte de complexos de transporte de proteínas [29,30,31].

O *RPGR* localiza-se no cromossoma X (Xp21.1) e existem mais de 10 transcritos de mRNA, apesar de nem todas serem traduzidas para proteínas. Todas estas incluem na região N-terminal um domínio RLD (*RCC1 like domain*, ou seja, domínio semelhante ao regulador de condensação cromossômica) localizada nos exões 1 ao 11, uma zona altamente conservada evolucionariamente. O RLD é um fator de troca de guanina de pequenos GTPases, que catalisa a conversão de GDP-GTPase, forma inativa, à forma ativa GTP-GTPase. O *RPGR* auxilia no transporte de proteínas através dos cílios, pois o RLD interage com RAB8a e ajuda na retenção de rab8a nos cílios e para além disso, *RPGR* interage com CEP290 e PCM1 que regulam a localização de RAB8A (Figura 4) [20,29,30].

Um dos transcritos amplamente expresso é o *RPGR*<sup>19</sup> constitutivo, com NM\_000328. Este tem 19 exões, é expresso em todos os tipos de células e encontrado na zona de transição de cílios ou nos centrossomos e centríolos nas células em divisão. Para além disto, *RPGR*<sup>19</sup> tem um C-terminal CTIL (C- cisteína, T-treonina, I-isoleucina, L- leucina) envolvido na localização ciliar do *RPGR* [20,29,30].

Por outro lado, *RPGR*<sup>ORF15</sup> com NM\_001034853, um outro transcrito essencial, está associado aos cílios primários da retina e tem 15 exões. O *RPGR*<sup>ORF15</sup> é maior do que a isoforma constitucional dada à região repetitiva no exão 15, ORF15 (*open reading frame 15*), um hot spot mutacional não conservado rico em glutamato-glicina. [20,29,30]. O C-terminal deste é altamente conservado, denominado de domínio básico, por ser constituído por aminoácidos básicos, que têm um papel na glutaminação de *RPGR*, pois interage com TTLL5 (que provoca esta alteração pós-traducionais na proteína) [32].

Apesar de *RPGR*<sup>19</sup> ser altamente expresso durante o desenvolvimento dos fotorreceptores, a sua expressão diminui em células adultas, o que sugere que este tem um papel funcional durante o desenvolvimento celular.

Por outro lado, a expressão de *RPGR*<sup>ORF15</sup> aumenta com a maturação dos fotorreceptores, sugerindo ter um papel na integridade destes. [29,31]. Além disso, dada a interação de *RPGR*<sup>ORF15</sup> com várias proteínas cíliares, a sua função provavelmente está envolvida no portão ciliar, no transporte ou seleção de cargas para transporte através do cílio (Figura 4) [29].

O *RPGR*<sup>ORF15</sup> interage com proteínas ciliares como RAB8 (o que influencia a seleção de rodopsina para as vesículas de transporte), interage com whirlin e usherina, influenciando o *turnover* da actina e com PDE6D, desempenhando um papel na seleção de cargas [12]. O *RPGR* também forma complexos com proteínas como *NPHP1*, *NPHP2*, *NPHP4*, *NPHP5*, *CEP290/NPHP6* (componente dos  $\gamma$ -links), proteínas motoras baseadas em microtúbulos e proteínas de transporte intraflagelar, como *IFT88* [20]. A região N-terminal de *RPGR* interage com *RPGRIP1*, *RPGRIP1L*, *SMC1*, *SMC3*. O C-terminal interage com nuclefosmina e Whirlin [20,29].

Como o *RPGR* coopera com várias proteínas ciliares, isso pode significar que existe uma sobreposição da sua função com outras doenças ciliares e pode explicar a sobreposição na caracterização fenotípica entre doenças [20]. Também foram identificadas proteínas que interagem com *RPGR* e que podem atuar como modificadores da doença, podendo afetar sua severidade, como *RPGRIP1L*, *CEP290* e *IQCB1* [12,20,29,30].

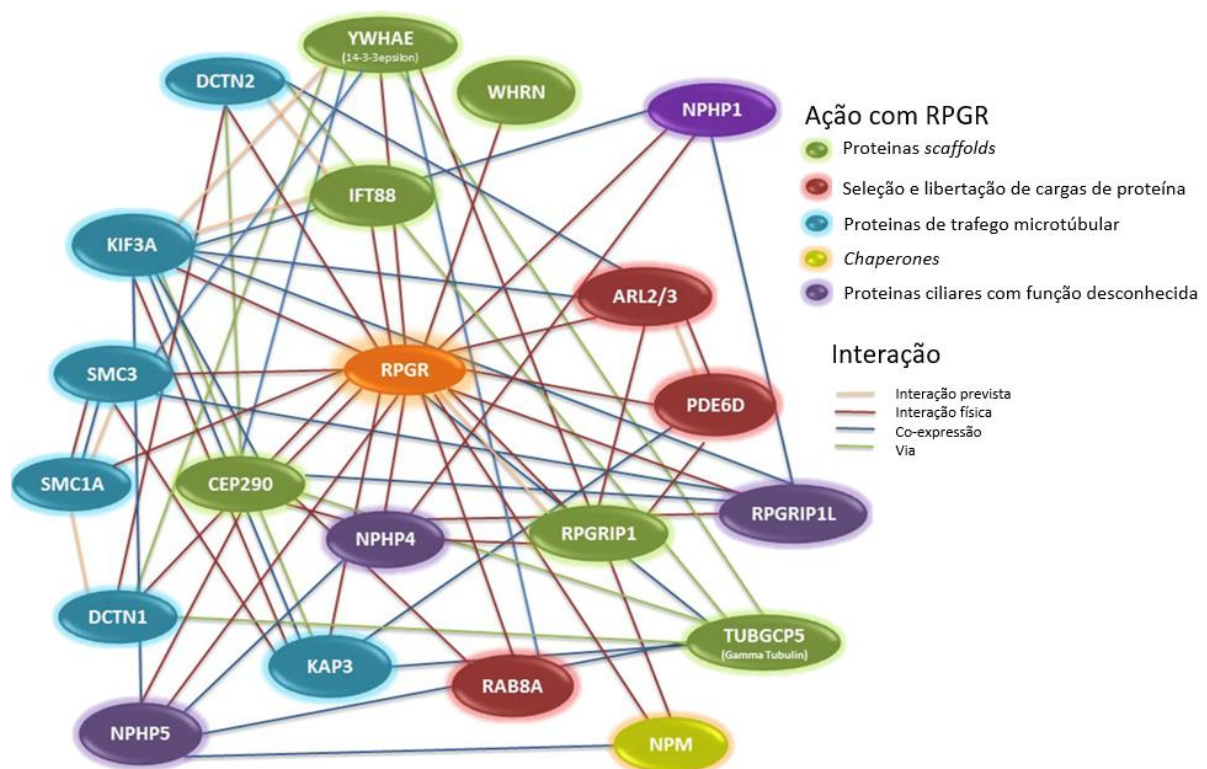


Figura 4- Interações de *RPGR* com outras proteínas. Fonte retirada e adaptada de Megaw, Roly D et al., 2015, <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.007>.

### 1.5.1 Variações fenótipo-genótipo de variantes no *RPGR*

Os diagnósticos clínicos de variantes em *RPGR* variam entre retinite pigmentosa ligada ao X (95 %), distrofia dos cones, cones e bastonetes, degeneração macular (3 %) ou ciliopatias (2 %) [30,33].

O ORF15 é um *hotspot* mutacional, causador de 50–60 % das retinites pigmentosas ligadas ao X, através de variantes *frameshift* ou *nonsense* que resultam em proteínas truncadas, devido a deleções de 1–5 pb [30,33,34,35,36]. Por outro lado, as variantes no domínio RLD, causadoras de doença, são principalmente devido a variantes *missense* e *inframe* [29,33,35,36].

Ao longo do gene *RPGR*<sup>ORF15</sup> existem variantes causadoras de doenças degenerativas dos bastonetes e cones. No entanto, variantes que afetam predominantemente bastonetes, são encontradas principalmente na região RLD do gene. Existe ainda, uma mudança progressiva do fenótipo ao longo do gene, sendo que mais perto do domínio básico, região perto do terminal 3' do ORF15, os cones são os fotorreceptores principalmente afetados [32,36,37,38].

Como *RPGR* é um gene ligado ao cromossoma X, a caracterização clínica no género feminino varia desde assintomático até a apresentação completa da doença, semelhante ao fenótipo no género masculino [20,29].

O estudo “The spectrum of structural and functional abnormalities in female carriers of pathogenic variants in the *RPGR* gene” (Mays Talib et.al, 2018) [39], investigou o fenótipo e a apresentação clínica de portadoras de mutações no gene *RPGR* (em heterozigotia). Este estudo mostrou que alterações pigmentares da retina ou sintomas visuais (como nictalopia, restrição do campo visual, etc.), foram comuns em 70 % das mulheres portadoras e que 23 % das mulheres portadoras apresentaram expressão completa da doença, porém em formas menos severas do que nos homens. Os resultados do estudo demonstram que os fenótipos clínicos não são raros em mulheres com mutações no gene *RPGR* em heterozigotia.

Além disso, outros artigos também relataram mutações em ORF15 no gene *RPGR* em mulheres, como por exemplo, a variante c.2323\_2324del encontrada em homozigotia e a variante c.2543del, que apresentavam fenótipo semelhante a casos hemizigóticos da família e que por isso, foram previamente assumidos como autossómico dominante [40,41].

A inativação do cromossoma X durante a fase embrionária ocorre de forma variável em diferentes conjuntos de células, resultando em mosaicíssimo, por divisão clonal. Apesar de *RPGR* ter inativação completa, o enviesamento da inativação do cromossoma X, ou seja, quando o cromossoma X materno ou paterno é preferencialmente inativando, pode ser a razão pela qual a doença se manifesta em mulheres portadoras [15, 39]. Para além disso, modificadores ambientais e genéticos podem influenciar a severidade e apresentação clínica no género feminino [37].

Os sintomas presentes no gênero feminino, com variantes em ORF15 no RPGR, incluem afinamento da retina periférico, miopia (sintoma comum), palidez do disco ótico, constrição do campo visual, *tapetal like reflex* (aparência refletiva/brilhante do fundo ótico), fundo ótico com espículas ósseas, “neve” visual (percepção constante de objetos semelhantes a flocos de neve no campo visual, podendo estes ter cores diferentes), cegueira aos 60–70 anos, nictalopia, cegueira noturna, astigmatismo (podendo ser em apenas um olho), atenuação de vasos sanguíneos, cataratas subcapsulares posteriores, atrofia macular e afinamento da coroide [39,41,42].

### **1.6 Otimização da sequenciação ORF15 do gene RPGR**

Dado ao aparecimento da demanda da sequenciação da região ORF15 do gene *RPGR*, o laboratório realizou a otimização do teste para o gene *RPGR* para essa região. Para isso, foram desenhados *primers* para ORF15 e cinco amostras de novos pacientes foram sequenciadas por Sanger. Dessas amostras, duas tiveram resultado positivo, sendo estes pertencentes a pacientes da mesma família. Uma das amostras é pertencente a um caso *index* (previamente identificado por WES e depois confirmado por Sanger) e a outra é pertencente à progenitora do caso *index*. O caso *index*, do sexo masculino, apresenta sintomas semelhantes à distrofia macular, distrofia de cones e bastonetes, e doença de Stargardt, com início dos sintomas aos 6 anos de idade. A progenitora do caso *index* (a segunda amostra com resultado positivo) possui a mesma variante em heterozigotia, mas não apresenta nenhum sintoma clínico, estando saudável. A variante familiar identificada é c.3178\_3179del p.(Glu1060Argfs\*18) na região terminal alternativa do exão 15 (ORF15) do gene *RPGR* (chr.X) (NM\_001034853.1). Esta variante leva à produção de uma proteína truncada conhecida por causar doença (Figura 5 e Figura 6).

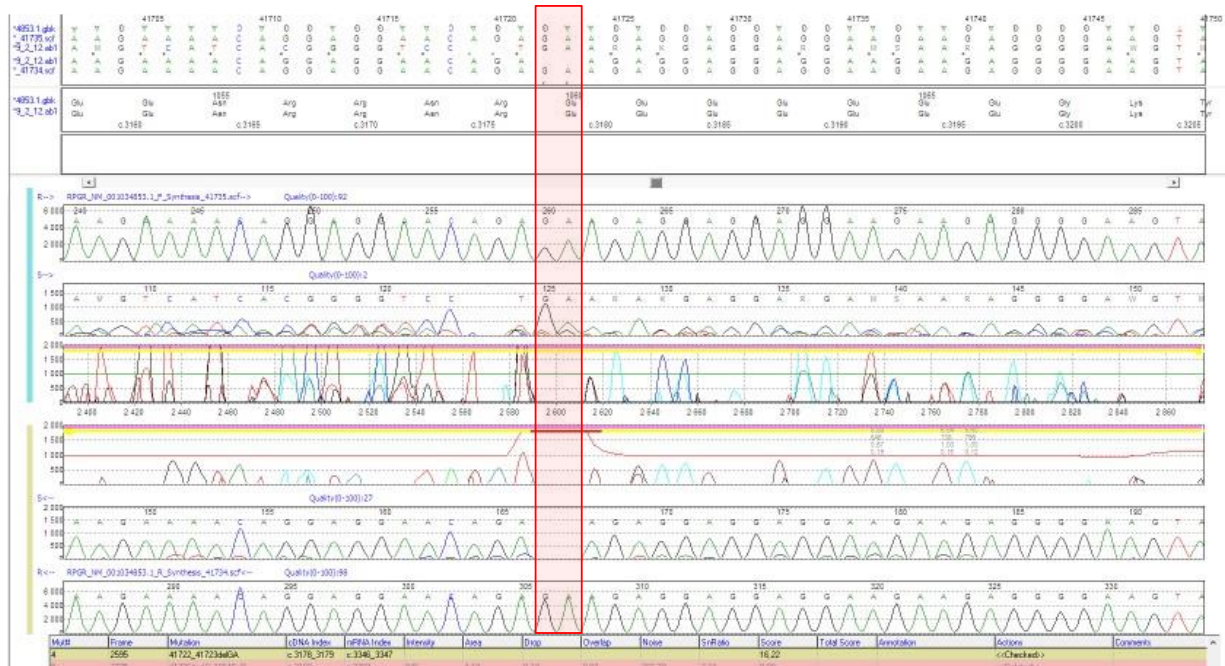


Figura 5- Resultado de Sanger positivo do caso índice. Mutaç o c.3178\_3179del em hemizigotia, assinalado pelo ret ngulo vermelho; A primeira fila de seq ncia refere-se   seq ncia de refer ncia, a segunda ao amplic o seq nciado, e a terceira   qualidade da leitura por base. Estas primeiras tr s filas correspondem   orienta o de leitura 5'- 3'. As tr s filas seguintes correspondem   qualidade da leitura por base, amplic o seq nciado e a seq ncia de refer ncia, estas pela ordem 3'- 5'. Imagem obtida a partir do Mutation Surveyor V5.1.2.

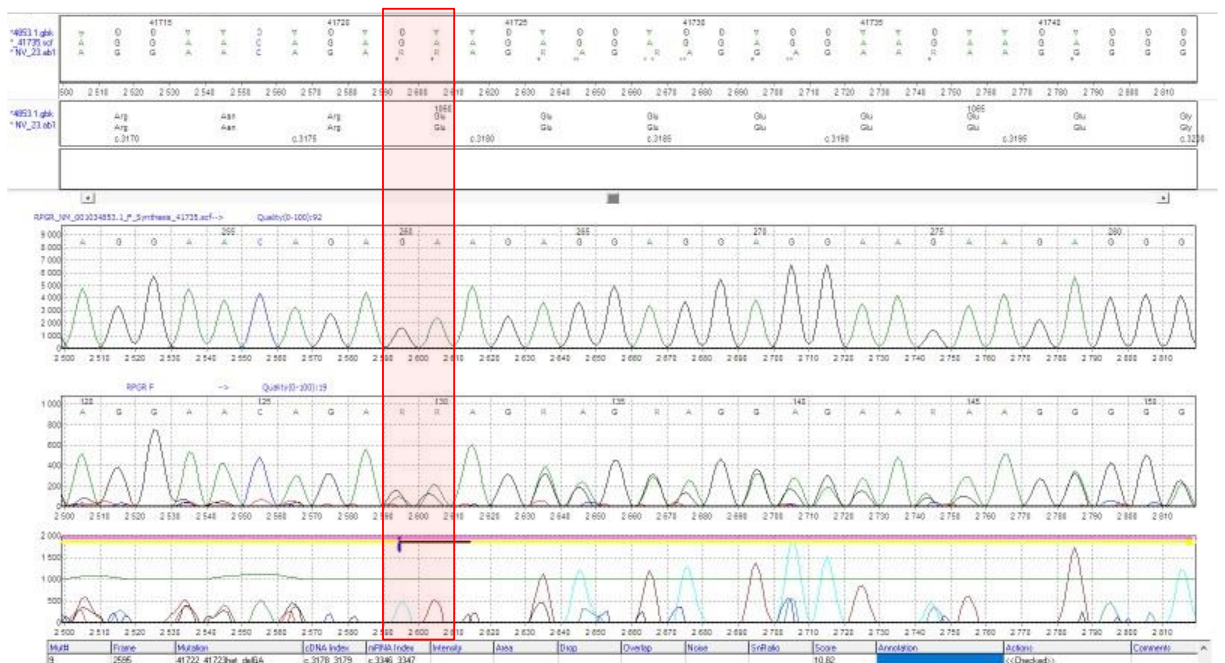


Figura 6- Resultado de Sanger positivo da progenitora do caso  ndice. Muta o c.3178\_3179del em heterozigotia assinalado pelo ret ngulo vermelho; A primeira fila de seq ncia refere-se   seq ncia de refer ncia, a segunda ao amplic o seq nciado, e a terceira   qualidade da leitura por base. Estas tr s filas correspondem   orienta o de leitura 5'- 3'. Imagem obtida a partir do Mutation Surveyor V5.1.2.

A seq nci o realizada por Sanger apresentou limita es como a necessidade de v rias repeti es do teste devido a resultados com leituras de baixa qualidade por base com

sobreposição de picos, dificultando a interpretação dos resultados, ou ao não alinhamento à sequência de referência.

Por outro lado, a técnica de sequenciação com *Capture based NGS* apresenta também limitações, como a dificuldade de capturar de *hotspots* mutacionais e regiões repetitivas, resultando numa menor especificidade, uma baixa cobertura e conseqüentemente, possíveis resultados falsos negativos [43, 44].

O ORF15 é uma região altamente repetitiva, de baixa complexidade e rica em purinas que excede 1Kb de tamanho, tornando-o um *hotspot* mutacional, no qual inserções e deleções ocorrem com frequência [44]. Dado à natureza desta região e possivelmente por adotar estruturas conformacionais anormais, como *hairpins*, e conseqüentemente causar deslizamento ou paragem na polimerase [45], a sequenciação e análise desta região torna-se difícil seja por Sanger como por NGS [35,44,45].

Diante dessas dificuldades, o objetivo deste projeto foi desenvolver novos *primers* para sequenciar essa região utilizando *NGS multiplex*, por meio de *amplicon based enrichment*, em vez de *hybridization capture based enrichment* usado no laboratório para painéis, o que irá permitir aumentar a cobertura dessa região difícil de sequenciar. Além disso, como o NGS permite sequenciar várias amostras em paralelo, irá permitir acompanhar o aumento de solicitações deste teste.

Foi ainda realizada uma análise descritiva dos testes executados pelo laboratório para as Retinopatias Hereditárias, com o objetivo de descrever melhor este grupo de patologias bem como selecionar casos potencialmente relacionados com *RPGR*, para serem usados na sequenciação do ORF15.

## 2 Métodos

### 2.1 Compilação da base de dados

Foram compilados os resultados de um painel de NGS de 309 genes para doenças retinianas e um painel de NGS de 190 genes de retinite pigmentosa. Destes resultados, retirou-se a informação clínica e sexo do paciente, localização do hospital de origem e resultado do teste, que inclui, em casos positivos, o gene afetado, a variante encontrada, zigotia e a classificação da variante. Após compilação, os dados foram formatados de forma a transformar os resultados em dados numéricos (por exemplo 0- negativo; 1- positivo), (Anexo 1). Esta conversão foi feita para a realização de estatística descritiva, utilizando o IBM SPSS Statistics 28.0.0.0 e o Excel. Foi estudada a proporção de resultados negativos/positivos, a representatividade dos testes por região, por sexo e por genes (nos resultados positivos) e a distribuição de tipo de variantes dentro dos resultados positivos (VUS, provavelmente patogénico ou patogénico). Além disso, a base de dados foi usada ainda para correlacionar a apresentação fenotípica nos genes mais frequentemente mutados.

### 2.2 Desenho de primers ORF15 e escolha do programa de amplificação

Para o desenho de *primers* foi realizada uma pesquisa bibliográfica com o objetivo de encontrar laboratórios que já tenham realizado esta otimização com sucesso. Destes foram encontrados 2 artigos candidatos (que sequenciaram a região com sucesso utilizando *primers* específicos para a região) [34,46]. O nome dos *primers*, utilizados para o projeto, foi atribuído segundo o gene, número do exão e iniciais do primeiro autor do artigo em que a sequência do *primer* foi retirada (Tabela 3 e Tabela 4). Utilizando os *primers* destes artigos, primeiro foi realizada uma revisão destes *primers* utilizando o SNPcheck, BiSearch, UCSC e o UMelT para verificar que estes não têm SNPs (single nucleotide polymorphisms), que são específicos, para confirmar que a temperatura de *melting* entre os primers não varia mais do que 2°C e para verificar a curva de *melting* do amplicão, o que permite escolher as condições de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Após revisão, apenas foi diminuído o tamanho do *primer reverse* do RPGR\_15\_NEID pois apresentava SNP (Tabela 4) e decidiu-se usar a enzima TaKaRa LA Taq HS para ambos os pares de primers, sendo este, a enzima já utilizada pelo laboratório para sequenciação de amplicões longos, regiões de alta

homologia entre genes (como em pseudogenes ou regiões reguladoras que controlam a expressão genética), e de sequências mitocondriais.

Tabela 3–Primer RPGR\_15\_LI utilizado e resultados da sua revisão

RPGR_15_LI	
<i>Primer forward</i>	5'-AGCCAGACAGTTACATGGAAGGTGCAA-3'
Tamanho do <i>Primer forward</i> (nº de pares de base)	27
<i>Primer reverse</i>	5'-TGTCTTTGGCTCCTTAACACAGCTGCA-3'
Tamanho do <i>Primer reverse</i> (nº de pares de base)	27
Tamanho do amplicão (nº de pares de bases)	2100
SNPs existentes na região dos <i>primers</i> (unidades)	0
Temperatura de <i>melting</i> dos <i>primers</i> (°C)	69.9-70.6
<i>Primer</i> específico para o amplicão alvo	sim
Número de picos na curva de <i>melting</i> do amplicão resultante (unidades)	2
Enzima usada	TaKaRa LA Taq HS

Notas: SNP- número de Single Nucleotide Polimorfisms;

Fonte: *primer* retirado de Li, Jianli et al., 2016, <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.06.007>

Tabela 4- *Primer* RPGR\_15\_NEID original e o alterado (utilizado) e resultados das suas revisões

RPGR_15_NEID		
	<i>Primer</i> original do artigo *	<i>Primer</i> alterado e usado
<i>Primer forward</i>	5'-GACTAAACCCATAATATCCAAATCCA-3'	5'-GACTAAACCCATAATATCCAAATCCA-3'
Tamanho do <i>Primer forward</i> (nº de pares de base)	26	26
<i>Primer reverse</i>	5'-GCCAAAATTTACCAGTGCCTCCTAT-3'	5'-CAAAAATTTACCAGTGCCTCCTA-3'
Tamanho do <i>Primer reverse</i> (nº de pares de base)	25	22
Tamanho do amplicão (nº de pares de bases)	1953	1951
SNPs existentes na região dos <i>primers</i> (unidades)	2	0
Temperatura de <i>melting</i> dos <i>primers</i> (°C)	60.5-64.5	60.5-58.3
<i>Primer</i> específico para o amplicão alvo	sim	sim
Número de picos na curva de <i>melting</i> do amplicão resultante (unidades)	2	2
Enzima usada	HotfireTaq ou HotstarTaq	TaKaRa LA Taq HS

Notas: SNP- número de Single Nucleotide Polimorfisms;

\*Fonte: sequência do *primer* retirado de Neidhardt, John et al., 2008, Molecular vision, 14, 1081-1093.

Para a decisão do programa de PCR a usar, teve-se em base as indicações da bula da enzima utilizada (TaKaRa LA Taq HS) e as otimizações realizadas anteriormente para o gene *PMS2*, em que também é utilizada a mesma enzima para PCR e é um gene difícil de sequenciar, por ter pseudogenes e uma região repetitiva.

### 2.3 Amostragem para testar os primers

Os *primers* escolhidos foram testados em amostras normais de ADN, ou seja, de indivíduos saudáveis, com controlos negativos para cada par de *primer*, para garantir que a região é amplificada e os *primers* são específicos (Tabela 5). Sendo que os *primers* que obtiveram o resultado esperado, ou seja, a amplificação específica do fragmento alvo, prosseguiram para o resto do ensaio de NGS para verificar se se obteve cobertura suficiente.

Tabela 5- Planeamento do primeiro ensaio para testar os dois pares de *primers*.

Posição tubo	A1	A2	A3	A4
Estudo (Amostra)	CN14_1	CN14_2	CNEG	CNEG
Amplificação	RPGR_LR15_NEID	RPGR_LR15_LI	RPGR_LR15_NEID	RPGR_LR15_LI

Para cada par de *primers* testado com uma amostra normal, também foi testado com um controlo negativo. CN14\_1- controlo normal nº14, alíquota 1; CN14\_2- controlo normal nº14, alíquota 2; CNEG- controlo negativo;

Assim, os *primers* que apresentaram os resultados desejados, foram utilizados para testar as amostras de ADN que haviam sido previamente testadas com Sanger, incluindo as três amostras que tiveram resultado negativo, além das duas amostras com resultado positivo anteriormente referido, totalizando cinco amostras.

Além disso, com base nos dados compilados dos painéis de NGS de retinite pigmentosa e de doenças retinianas, foram selecionadas nove amostras de ADN para serem também testadas com estes *primers*. Estas amostras foram selecionadas utilizando os seguintes critérios:

- Indicação na informação clínica de hereditariedade ligada ao X;
- Presença de pelo menos um familiar masculino afetado que não seja uma transmissão de pai para filho;

Não foi possível selecionar amostras com base no fenótipo, dado que as informações clínicas dos pacientes eram limitadas ou quase inexistentes. No entanto, foi possível excluir alguns indivíduos com base nos critérios de seleção referidos.

## 2.4 Ensaio de NGS

### 2.4.1 Extração de ADN

As amostras de ADN foram obtidas através da extração automática de sangue periférico utilizando QIASymphony, técnica baseada em sílica com utilização de partículas magnética, de forma a obter uma concentração aproximadamente 75 ng/ $\mu$ L. Após extração, foi avaliada a quantidade e qualidade da amostra, utilizando Epoch 2 Microplate Spectrophotometer, e a integridade (com o objetivo de avaliar a degradação da amostra) recorrendo à corrida de eletroforese. A concentração mínima aceitável utilizada é de 20 ng/ $\mu$ L e a razão A260/A280 entre 1.5–2. Por fim a amostra foi diluída de forma a obter-se uma alíquota de ADN a 20 ng/ $\mu$ L com volume 50  $\mu$ L. Todo este procedimento anteriormente referido foi executado pelo departamento de extração do laboratório.

### 2.4.2 Amplificação

Primeiramente, foi preparado o *mix* de *primers* através da adição de 10  $\mu$ L *Primer Forward* (ORF15), 10  $\mu$ L *Primer Reverse* (ORF15), das soluções stock respetivas a 100 nmol/ $\mu$ L, e 80  $\mu$ L de água autoclavada num microtubo de 1.5 mL. De seguida, preparou-se a *mix* de reagentes com as seguintes quantidades do kit TaKaRa LA Taq Hot Start Version, realizadas no frio para com duas reações em excesso. Ou seja, por amostra preparou-se 18.5  $\mu$ L de água livre de RNAses, 5  $\mu$ L de 10x LA PCR buffer, 8  $\mu$ L de dNTP mix e 0.5  $\mu$ L da enzima Takara LA Taq HS. Seguidamente, as preparações dos tubos de amostras para o PCR foram realizadas numa placa fria e foi acrescentado por amostra 32  $\mu$ L da *mix* dos reagentes e 10  $\mu$ L da *mix dos primers* e 8  $\mu$ L de ADN a 20 ng/ $\mu$ L, excetuando o controlo negativo, que em vez de ADN, adicionou-se 8  $\mu$ L de buffer ATE do QIASymphony DNA Mini Kit (fornecido pelo departamento de extração). A Tabela 6 representa o programa de PCR utilizado no passo seguinte, que corresponde ao utilizado também para o gene PMS2 já otimizado:

Tabela 6– Programa de PCR utilizado

		Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos (nº)
Ativação		94	1 min	1x
Amplificação	Desnaturação	98	15 s	30x
	Annealing	68	20 min	
	Extensão			
Extensão final		72	10 min	1x
Hold		10	∞	

### 2.4.3 Eletroforese em gel de Agarose

Para analisar e validar a amplificação por PCR (controle de qualidade interno) foi utilizado o Qiagen QIAxcel, de acordo com o manual de instruções disponibilizados pelo fornecedor, utilizando marcador de 15–5000 pb, sendo que o nosso amplicão tem por volta 2000 pb.

### 2.4.4 Purificação dos produtos de amplificação

Foi pipetado 30 µL dos produtos de PCR para uma MIDI plate (placa de 96 poços) e nestes foi ressuspensionado 54 µL de beads CLeanNGS (esferas magnéticas) e depois foi incubado 5 min à temperatura ambiente e novamente 5 min na placa magnética. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado 200 µL etanol a 70 % e incubado por 30 segundos após retirar o etanol sem tocar nas esferas magnéticas. Foi repetida a lavagem com etanol e após isso, as esferas magnéticas foram secas no termociclador em pausa aos 37 °C. Assim que os aglomerados formados pelas esferas magnéticas formaram uma fissura, foi adicionado 40 µL de água (Ambion DEPC- treated water) e a solução foi homogeneizada e incubada durante 2min à temperatura ambiente e novamente 2 min na placa magnética. Por fim, foi retirado 27 µL do sobrenadante (ou todo ele) e transferido para novos poços.

### 2.4.5 Quantificação e diluição dos amplicões purificados

Foi preparado o *mix* de quantificação utilizando o kit Qubit dsDNA BR Assay, suficiente para o número de reações necessárias incluindo 2 *standards* mais duas reações em excesso, sendo que para cada reação é adicionada 199 µL de *buffer* BR e 1 µL de fluoróforo. Após a preparação da *mix*, foram preparadas alíquotas para a quantificação, adicionando 198 µL do *mix* de quantificação e 2 µL de amostra, com exceção das alíquotas dos *standards*, onde foi adicionado 190 µL da *mix* e 10 µL do *standard*. Para a quantificação, foi utilizado o Qubit 2.0, de acordo com as instruções do fornecedor. Com base nos resultados da quantificação, em novos tubos, as amostras foram diluídas, de forma a obter uma concentração de 10 ng/µL utilizando água HPLC

como diluidor e foi novamente quantificado para confirmar a concentração. Por fim, num novo tubo, juntou-se 5  $\mu\text{L}$  de cada diluição que pertencem à mesma combinação de *indexes* (*pool* de amostras) num mesmo tubo.

#### **2.4.6 Fragmentação e Tagmentação**

Utilizando o kit SureSelect QXT Library Prep, em tubos de PCR foram preparados por cada poço, 17  $\mu\text{L}$  de QXT buffer, 4  $\mu\text{L}$  de QXT enzyme Mix ILIM e 2  $\mu\text{L}$  da amostra. A fragmentação foi realizada com o seguinte programa de PCR (pré-aquecido): 1 ciclo a 45 °C, por 10 min, e 1 ciclo a 4 °C, por 1 min (com *hold* a 4 °C). Por fim, após terminada a corrida de PCR, foi adicionado 32  $\mu\text{L}$  de QXT Stop solution (realizado sob uma placa fria) e depois foi incubado à temperatura ambiente durante 1 min.

#### **2.4.7 Purificação dos produtos de Tagmentação**

Foi pipetado 60  $\mu\text{L}$  dos produtos de PCR para uma MIDI plate e nestes foi ressuspendido 65  $\mu\text{L}$  de beads CLeanNGS (esferas magnéticas) e depois foi incubado 5 min à temperatura ambiente e novamente 5 min na placa magnética. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 70 % e incubado por 1 min. Depois o etanol foi retirado sem tocar nas esferas magnéticas e foi novamente repetida a lavagem com etanol. Após isso, as esferas magnéticas foram secas no termociclador em pausa, aos 37 °C. Assim que os aglomerados formados pelas esferas magnéticas formaram uma fissura, foi adicionado 11  $\mu\text{L}$  de água (Ambion DEPC-treated water) e a solução foi homogeneizada, incubada durante 2 min à temperatura ambiente e novamente colocada 2 min na placa magnética. Por fim, foi retirado todo o sobrenadante e transferido para novos poços.

#### **2.4.8 Ligação de sequências identificadoras de amostra (*indexes*) para NGS por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

Primeiro foi preparado ao frio, o *mix* de PCR utilizando o kit SureSelect QXT Library Prep para o número necessário de reações mais dois em excesso. Para cada reação foi colocado 13.5  $\mu\text{L}$  de água livre de nucleases, 10  $\mu\text{L}$  de Herculase II 5x Reaction Buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  de 100 mM dNTP mix e 1  $\mu\text{L}$  de Herculase II fusion DNA polymerase. Numa placa fria, foi adicionado em cada tubo, 25  $\mu\text{L}$  do *mix* de PCR preparada, 1  $\mu\text{L}$  do *index*P7 e 1  $\mu\text{L}$  do *index*P5 adequado a cada tubo/biblioteca

(pertencente ao mesmo kit referido) e 10  $\mu\text{L}$  de ADN purificado. O programa de PCR utilizado para a ligação dos *indexes* foi a seguinte: 1 ciclo a 98 °C por 2 min, 6 ciclos a 98 °C por 30 seg, a 58 °C por 30 seg e a 72 °C por 1 min e por fim 1 ciclo a 72 °C por 5 min (com *hold* a 4 °C).

#### **2.4.9 Purificação dos produtos de amplificação**

Foi pipetado 40  $\mu\text{L}$  dos produtos de PCR para uma MIDI plate e nestes foi ressuscitado 60  $\mu\text{L}$  de beads CLeanNGS (esferas magnéticas) e depois foi incubado 5 min à temperatura ambiente e novamente 5 min na placa magnética. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 70 % e incubado por 1 min após retirar o etanol sem tocar nas esferas magnéticas. Foi repetida a lavagem com etanol e após isso, as esferas magnéticas foram secas no termociclador em pausa aos 37 °C. Assim que os aglomerados formados pelas esferas magnéticas formaram uma fissura, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de água (Ambion DEPC- treated water) e a solução foi homogeneizada e incubada durante 2 min à temperatura ambiente e novamente 2 min na placa magnética. Por fim, foi retirado todo o sobrenadante e transferido para novos poços.

#### **2.4.10 Avaliação e pooling das bibliotecas**

Para a avaliação das bibliotecas foi utilizado novamente o Qubit 4.0, descrito anteriormente, e ainda foi realizada a avaliação utilizando a TapeStation, a D1000 ScreenTapes, incluindo os reagentes High Sensitivity D1000 e o respetivo software de acordo com as instruções do fornecedor. Para tal, foram realizadas alíquotas adicionando 2  $\mu\text{L}$  de D1000HS Sample Buffer e 2  $\mu\text{L}$  das bibliotecas. Segundo os resultados das quantificações, num novo tubo, foram adicionadas quantidades específicas de cada *pool* e de RSB (*ressuspension buffer*), de forma a obter-se uma concentração de 10 nM. A partir deste, foi realizada uma nova diluição com 12  $\mu\text{L}$  da *pool* a 10 nM e 18  $\mu\text{L}$  de RSB, de forma a obter uma concentração de 4 nM. De seguida, estas duas *pools* preparadas (tubo a 10 nM e outro a 4 nM) foram novamente avaliadas na TapeStation, cada um em triplicado, com o objetivo de confirmar se as concentrações foram preparadas com sucesso.

#### **2.4.11 Sequenciação NGS**

Num novo tubo, foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de NaOH a 0,2 N e 5  $\mu\text{L}$  da *pool* a 4 nM para desnaturar o ADN e foi incubada por 5 min. De seguida, utilizando o KIT MiSeq reagente Nano v2 da Illumina, foi adicionado 990  $\mu\text{L}$  de HT1 à *pool* desnaturada (para a desnaturação). Depois, foi colocado 270  $\mu\text{L}$

deste (*pool* com HT1) num novo tubo e adicionado 330  $\mu$ L de HT1 de forma a obter uma diluição de 9 pM (*pool* final). A MiSeq *cartridge* da Illumina foi preparada para a corrida, preparando uma *mix* de *primer 1* (com *buffer* do poço 12 da *cartridge* e 3  $\mu$ L de *primer 1*), uma *mix* de *index* (com *buffer* do poço 13 da *cartridge* e 3  $\mu$ L de *index*) e uma *mix* de *primer 2* (com *buffer* do poço 14 da *cartridge* e 3  $\mu$ L de *primer 2*). Por fim a *cartridge* foi carregada com a *mix* de *primer 1* no poço 18, *mix* de *index* no poço 19, *mix* de *primer 2* no poço 20, 600  $\mu$ L da *pool* diluída a 9 pM no poço 17 e a corrida de NGS pela Illumina MiSeq foi iniciada, conforme as instruções do fornecedor.

#### **2.4.12 Controlo de qualidade e classificação de variantes**

A ferramenta bioinformática para a análise da qualidade da corrida de NGS utilizada é a BaseSpace, o que permite avaliar o %Q30 e %PF (qualidade das bases e *clusters*), que devem estar acima 80 %, *indexing QC*, que permite avaliar a representatividade dos *index* (e indiretamente da amostra), devendo esta ser homogénea, e a densidade dos *clusters* que deve estar entre 600–1000. Foi utilizado o programa Dragen Germline Pipeline V.3.2.8 (illumina) para o alinhamento e a obtenção da Bam e VCF, utilizando como sequência de referência *Homo Sapiens* (UCSC hg19). Para desenhar a BED necessária (que inclui o exão desejado +/- 8 pb), para a geração da Bam e VCF, foi utilizado UCSC. Foi utilizado o Omnomics para avaliar a qualidade dos resultados (*quality report*). Neste deu-se atenção a qualidade das bases, devendo ter uma leitura maior ou igual a 20, e a percentagem de cobertura a 20x ser 100 %. Para a classificação das variantes encontradas, foi utilizado a Alissa Interpret para filtrar estas variantes, recorrendo ao ficheiro VCF, e o Alamut Visual Plus v.1.6.1 para auxiliar a classificação destas variantes, segundo as *guidelines* da ACMG (por precaução, as outras variantes filtradas também foram classificadas, podendo ter alguma significância). Quanto à Alissa interpret, os filtros aplicados sobre as variantes encontradas, foram desenhados pelo laboratório. A Figura 7 representa o algoritmo programado na Alissa utilizado.

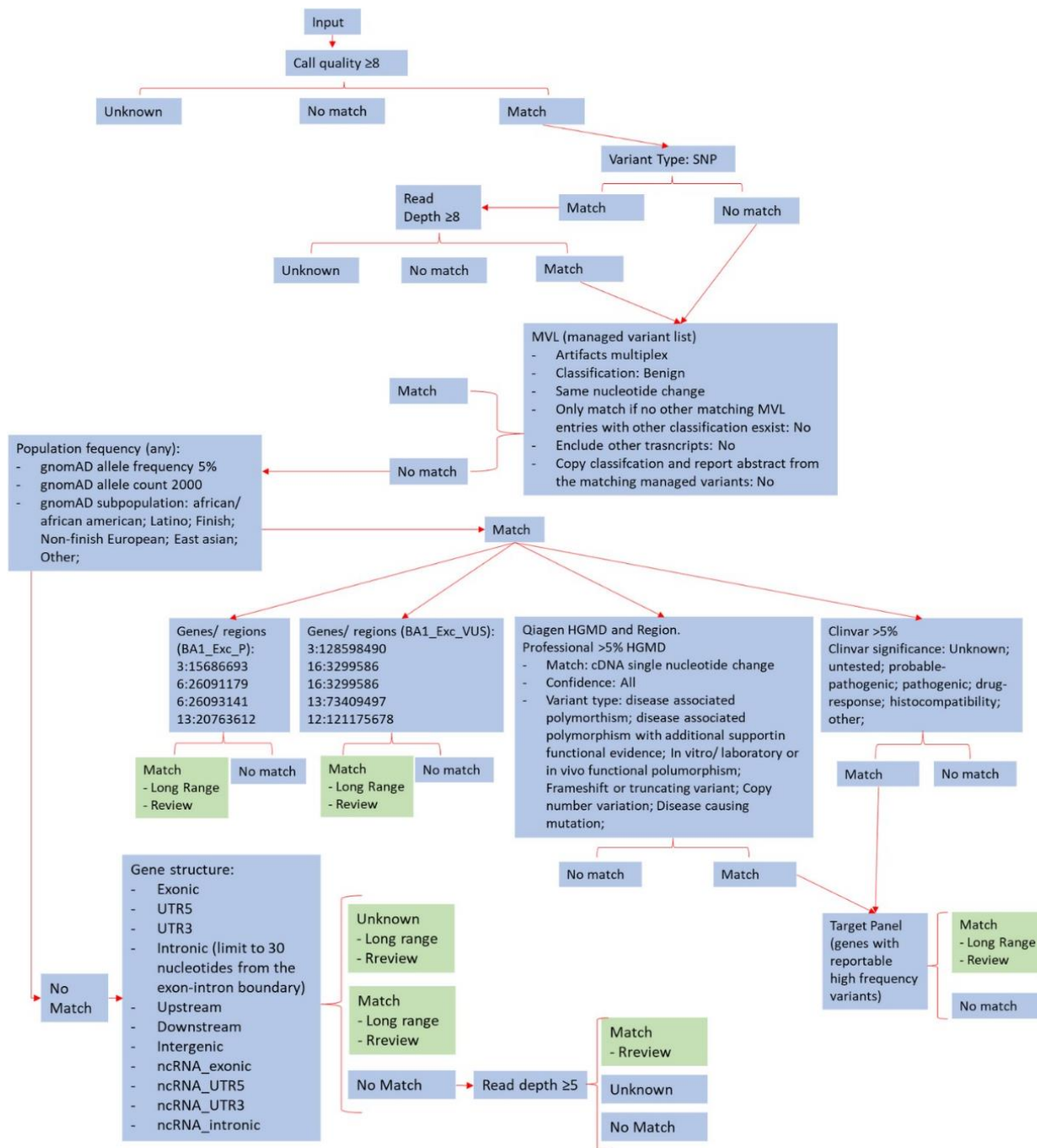


Figura 7- Workflow do processo de filtragem e os seus critérios, usada para as variantes encontradas. Este algoritmo foi desenhado na Alissa Interpret. O *input* corresponde às variantes presentes no ficheiro VCF. As variantes que passam o processo de filtragem irão pertencer a uma das caixas verdes (*match*).

### 3 Resultados

#### 3.1 Compilação dos resultados dos painéis e sua análise descritiva

Foram compilados os resultados de um painel de 309 genes para doenças retinianas e um painel de 190 genes de retinite pigmentosa. Esta compilação resultou num conjunto de 592 resultados das quais 182 (30.7 %) eram negativas e 410 (69.3 %) positivos, das quais 187 pertenciam ao painel para retinite pigmentosa e 223 ao painel para doenças retinianas. A maioria dos resultados provêm de pacientes de Portugal (553), dos quais 469 são de Coimbra. Esta maior representatividade na região de Coimbra, deve-se à existência de mais contratos com hospitais e laboratórios dessa região.

Dentro dos 223 resultados positivos do painel para doenças retinianas, 123/223 (55.16 %) tinham uma variante causadora de retinite pigmentosa.

Dentro de todos os casos positivos, as distribuições das diferentes classificações de variantes são semelhantes, sendo que 38.46 % são classificados como patogénicos, 31.95 % como provavelmente patogénicos e 29.59 % como VUS (Figura 8).

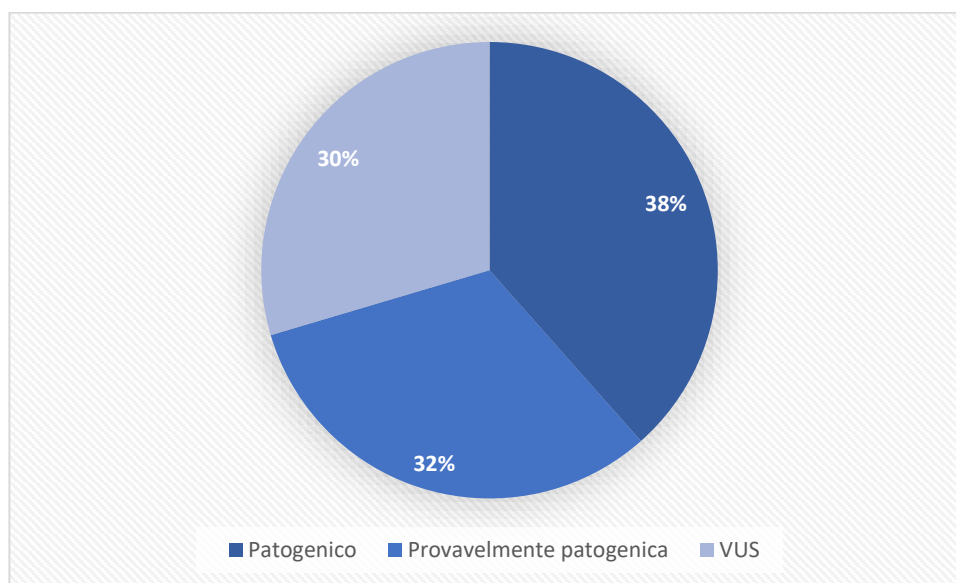


Figura 8- Percentagem de variantes patogénicas, provavelmente patogénicas e de significado incerto. VUS- variante de significado incerto. Obtida utilizando o IBM SPSS.

Quanto ao sexo, foram estudados 316 mulheres e 276 homens. Para além disto, 52.2 % dos homens e 62.3 % das mulheres apresentam retinite pigmentosa (57.6 % dos indivíduos), provando que é uma das doenças mais comuns das doenças hereditárias da retina.

A maioria das variantes detetadas, encontravam-se nos genes *ABCA4* (15.8 %), *EYS* (11.3 %) e *USH2A* (8.1 %), o que corresponde aos dados globais do artigo anteriormente referido [3]. No

entanto, ao contrário desses dados globais, o *RPGR* não se encontra como um dos mais mutados (3 casos, ou seja, 0,6 %) nos resultados do laboratório (Tabela 7, Figura 9).

Nos casos com variantes encontradas em *ABCA4*, as mais comuns foram c.1804C>T (15 indivíduos), c.5882G>A (10 indivíduos) e 18 indivíduos que apresentaram as duas variantes c.5044\_5058del e c.4926C>G, sendo que 8 casos partilhavam 3 destas variantes.

Tabela 7- Distribuição dos genes resultantes da compilação dos painéis WES de retinopatias hereditárias e de doenças retinianas do laboratório

GENE	N	%	GENE	N	%	GENE	N	%
<i>ABCA4</i>	82	15,8	<i>PRPF4</i>	3	0,6	<i>PDE6C</i>	1	0,2
<i>EYS</i>	59	11,3	<i>RPGR</i>	3	0,6	<i>SLC38A8</i>	1	0,2
<i>USH2A</i>	42	8,1	<i>CDH3</i>	3	0,6	<i>TULP1</i>	1	0,2
<i>CRB1</i>	18	3,5	<i>PDE6B</i>	3	0,6	<i>NMNAT1</i>	1	0,2
<i>CNGA3</i>	16	3,1	<i>AHI1</i>	3	0,6	<i>SPATA7</i>	1	0,2
<i>CNGB3</i>	13	2,5	<i>PRPF6</i>	3	0,6	<i>SEMA4A</i>	1	0,2
<i>RP1</i>	13	2,5	<i>SNRNP200</i>	3	0,6	<i>ZNF513</i>	1	0,2
<i>CERKL</i>	13	2,5	<i>RS1</i>	3	0,6	<i>CYP4V2</i>	1	0,2
<i>RPE65</i>	12	2,3	<i>IMPG2</i>	2	0,4	<i>ARSG</i>	1	0,2
<i>RHO</i>	12	2,3	<i>TOPORS</i>	2	0,4	<i>KLHL7</i>	1	0,2
<i>RDH12</i>	11	2,1	<i>RIMS1</i>	2	0,4	<i>IMPDH1</i>	1	0,2
<i>PRPF31</i>	10	1,9	<i>AGBL5</i>	2	0,4	<i>CDH23</i>	1	0,2
<i>NR2E3</i>	10	1,9	<i>ARL2BP</i>	2	0,4	<i>CDHR1</i>	1	0,2
<i>RDH5</i>	8	1,5	<i>HMCN1</i>	2	0,4	<i>BBS2</i>	1	0,2
<i>MERTK</i>	8	1,5	<i>NRL</i>	2	0,4	<i>RBP4</i>	1	0,2
<i>P83</i>	7	1,3	<i>CNNM4</i>	2	0,4	<i>NPHP1</i>	1	0,2
<i>PRPH2</i>	7	1,3	<i>IQCB1</i>	2	0,4	<i>OAT</i>	1	0,2
<i>BBS1</i>	7	1,3	<i>AIPL1</i>	2	0,4	<i>MAK</i>	1	0,2
<i>KCNV2</i>	6	1,2	<i>KIAA1549</i>	2	0,4	<i>OPN1LW</i>	1	0,2
<i>CHM</i>	6	1,2	<i>MYO7A</i>	2	0,4	<i>GUCY2D</i>	1	0,2
<i>HGSNAT</i>	6	1,2	<i>ADGRV1</i>	2	0,4	<i>CACNA2D4</i>	1	0,2
<i>ROM1</i>	6	1,2	<i>PRPF8</i>	2	0,4	<i>SLC24A1</i>	1	0,2
<i>WDR19</i>	6	1,2	<i>PCARE</i>	2	0,4	<i>PCDH15</i>	1	0,2
<i>CRX</i>	5	1,0	<i>LCA5</i>	2	0,4	<i>ADAM9</i>	1	0,2
<i>CEP290</i>	5	1,0	<i>HK1</i>	2	0,4	<i>RP1L1</i>	1	0,2
<i>CNGB1</i>	5	1,0	<i>CLN3</i>	2	0,4	<i>ABHD12</i>	1	0,2
<i>IMPG1</i>	5	1,0	<i>ALMS1</i>	2	0,4	<i>ATF6</i>	1	0,2
<i>BEST1</i>	4	0,8	<i>FSCN2</i>	1	0,2	<i>EFEMP1</i>	1	0,2
<i>IFT140</i>	4	0,8	<i>TRPM1</i>	1	0,2	<i>WHRN</i>	1	0,2
<i>COL18A1</i>	4	0,8	<i>dup(16)(p11.2)</i>	1	0,2	<i>SAG</i>	1	0,2
<i>PDE6A</i>	4	0,8	<i>LRP5</i>	1	0,2	<i>RP2</i>	1	0,2
<i>RPGRIP1</i>	4	0,8	<i>CNGA1</i>	1	0,2			
<i>LRAT</i>	3	0,6	<i>POC1B</i>	1	0,2			

N- Número de casos; %- percentagem;

Tabela obtida utilizando o IBM SPSS.

Além disso, 13 (2,2 %) das variantes encontradas pertenciam a genes ligados ao X, sendo que uma das variantes foi encontrada num indivíduo feminino.

Ainda, 70/97 (72.2 %) dos genes com variantes encontradas, ou seja, a maioria dos genes, aparecem numa frequência abaixo de 1 % (Tabela 7).

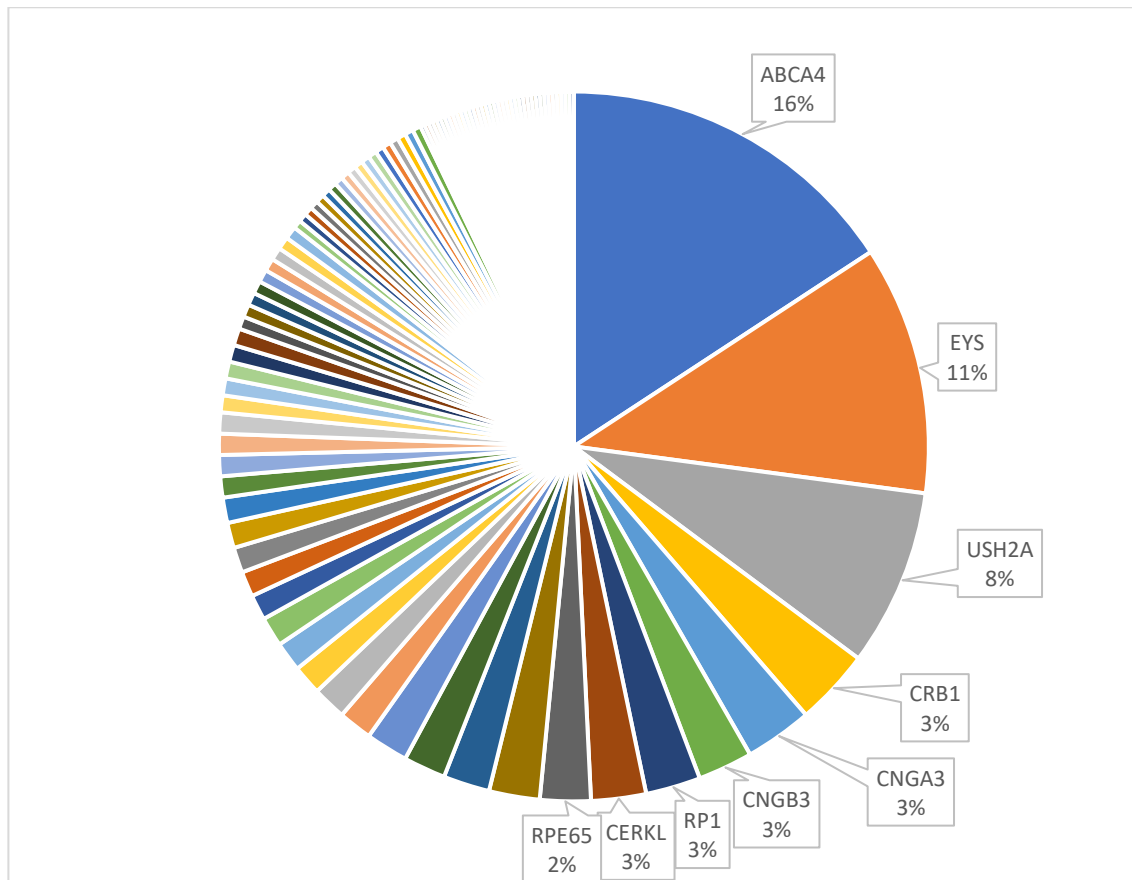


Figura 9- Distribuição dos genes com variantes causadoras de retinopatias hereditárias, a partir da compilação realizada dos painéis de retinopatias hereditárias e de doenças retinianas. É possível observar que a maioria dos genes com variantes encontradas aparecem numa frequência baixa. Figura obtida utilizando o *IBM SPSS* e o *Excel*.

### 3.1.1 Caracterização fenotípica dos genes mais mutados

Sendo que a maioria dos genes aparecem nos dados com frequência <1 %, apenas foram avaliados fenotipicamente os genes com maior representatividade, ou seja, os genes *ABCA4*, *EYS* e *USH2A*, pois são nos que há 29, 36 e 24 pacientes com informação clínica disponível, respetivamente. É de notar que a quantidade de informação clínica disponível por paciente é variada e como tal, os resultados não serão completos.

Variantes patogénicas no gene *ABCA4* causam distrofia dos cones e bastonetes 3 (MIM 604116), doença de Stargardt 1 (MIM 248200) e retinite pigmentosa 19 (MIM 601718), com hereditariedade autossómica recessiva. 17/29 (58.62 %) dos casos são de indivíduos femininos e 12/29 (41.38 %) são casos de indivíduos masculinos. Nove indivíduos apresentaram retinite pigmentosa com aparecimento principalmente na infância e um aos 20 anos. Em três casos, os cones/cones-bastonetes estavam afetados, com aparecimento em idades variadas (infância, idade escolar ou 24 anos). Treze dos casos apresentavam distrofia macular/Stargardt com

aparecimento principalmente na infância ou jovens adultos, excetuando um dos casos que se manifestou aos 51 anos. Em quatro casos, a informação clínica foi mais detalhada, relatando características fenotípicas como distrofia multifocal em padrão, *favimaculatus*, estrabismo, atrofia fóveal com alterações pigmentares, disfunção grave generalizada da retina a nível dos fotorreceptores, dificuldades motoras, especialmente motricidade fina, pouca força muscular e ligeiro atraso motor (andar aos 24 meses) ou fotofobia.

Variantes patogénicas no gene *EYS* causam retinite pigmentosa 25 (MIM 602772), com hereditariedade autossómica recessiva. Quanto aos indivíduos diagnosticados com variantes em *EYS*, 17/36 (47.2 %) eram mulheres e 19/36 (52.8 %) homens. Nestes dados, o início varia dos 6 aos 60 anos de idade. Todos os indivíduos apresentaram sintomas de retinite pigmentosa, nomeadamente atrofia periférica, com espículas de pigmento, maculopatia bilateral, nictalopia, perda de visão progressiva, discromatopsia, miopia, astigmatismo e constrição do campo visual. Além disso, quatro indivíduos apresentaram outras características menos comuns como glaucoma no olho, neuropatia ótica isquémica, surdez ligeira bilateral neuro sensorial, descolamento do vítreo ou catarata bilateral.

Quanto às variantes patogénicas no gene *USH2A*, estas causam retinite pigmentosa 39 (MIM 6138093) ou síndrome de Usher tipo 2A (MIM 276901), ambas de hereditariedade autossómica recessiva. De entre os resultados positivos com variantes neste gene, 10/24 (41.7 %) são mulheres e 14/24 (58.3%) são homens. Todos os casos apresentaram retinite pigmentosa e 13/24 (54.2 %) tinham alterações auditivas/surdez, com aparecimento na infância/idade escolar, excetuando um caso com incidência à nascença. Quanto à retinite pigmentosa e perda de visão, estes apareceram mais tarde, entre os 10 e 39 anos de idade, e com manifestações como a degeneração macular, miopia evolutiva, diminuição da acuidade visual ou fotofobia. Além disso, 6 indivíduos apresentaram outras características como QI normal com características dismórficas (incisivos proeminentes, sobrancelhas pesadas), insuficiência renal, enxaquecas na infância, espondilite anquilosante, Diabetes Mellitus tipo 2, dislipidemia ou nictalopia.

### **3.2 Validação dos novos primers desenhados com amostras normais**

Quanto aos dois pares de *primers* desenhados, as amplicões resultantes do PCR têm por volta de 2000 pb, sendo que se espera na eletroforese em gel de agarose, usada para avaliação do PCR, bandas desse tamanho.

Podemos observar na Figura 10 que apenas o par de *primer* RPGR\_15\_LI apresentou amplificação e esta encontra-se no tamanho desejado, mostrando-se também específico pois não apresenta bandas de outros tamanhos.

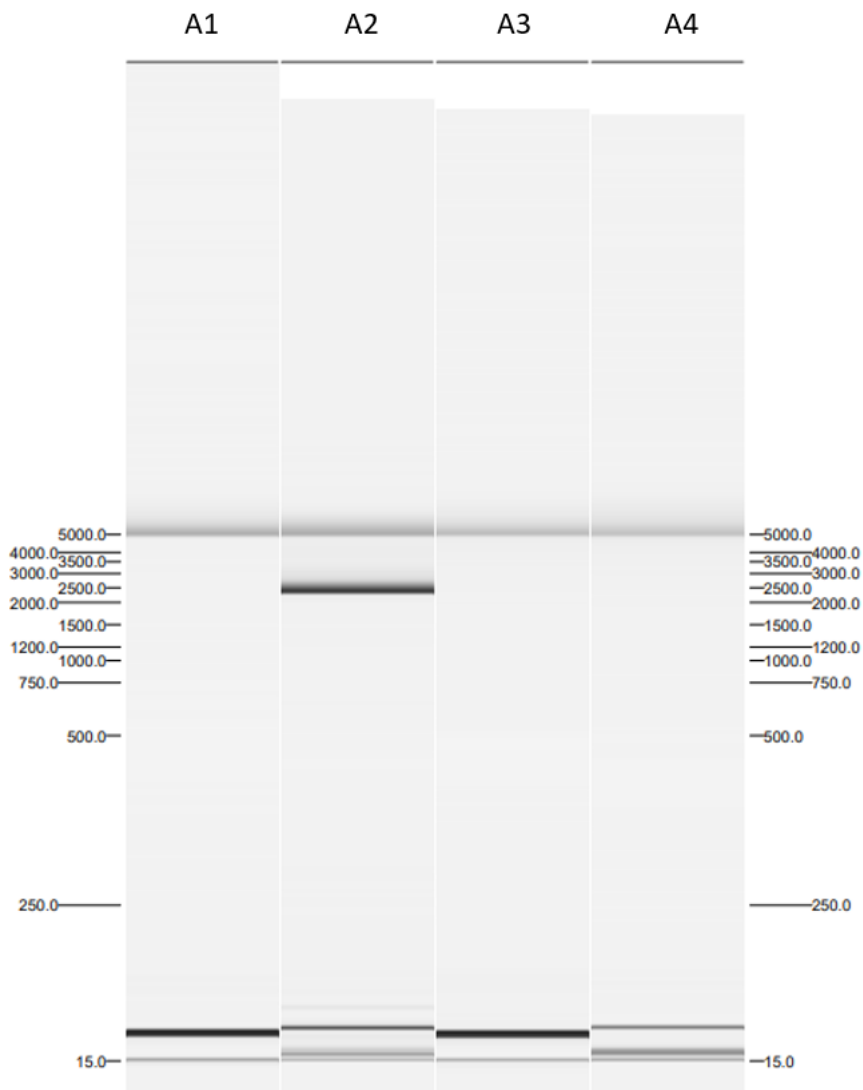


Figura 10- Resultado da corrida de eletroforese em gel, em amostras normais. É possível verificar que apenas na segunda amostra houve amplificação, dado que se observa uma banda por volta dos 2000pb, correspondendo ao caso com os primers RPGR\_15\_LI. As bandas representadas perto dos 15pb podem representar lixo, alguma degradação de ADN ou resultado de primer dímer; A1- Controlo normal com RPGR\_15\_NEID; A2- Controlo normal com RPGR\_15\_LI; A3- controlo negativo com RPGR\_15\_NEID; A4- controlo negativo com RPGR\_15\_LI;

Quanto à sequenciação por NGS, esta passou os controlos de qualidade, sendo que a qualidade por base, em média, foi maior que 19, a cobertura foi sempre superior a 20 (dados obtidos pelo Omnomics) e a cobertura média e a mediana foram de 1196 leituras (Figura 11).

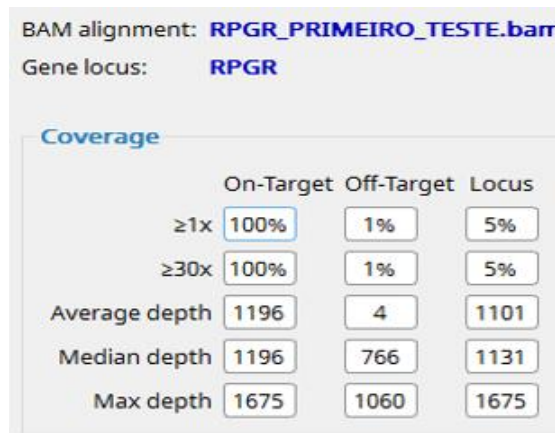


Figura 11-Estatística da cobertura das leituras por base da amostra normal. Locus- corresponde à região *on-target* e *off-target*; Imagem obtida através do Alamut 1.6.1 usando o ficheiro Bam e BED para ORF15 +/- 8 pb

### 3.3 Variantes encontradas das amostras de Sanger e dos Painéis

Ao testar as amostras de ADN, provenientes da sequenciação de Sanger e dos painéis, com o *primer* RPGR\_15\_LI, os resultados de NGS passaram o controlo de qualidade correspondente a um Q30 e %PF maior a 80 %, densidade entre 600 a 1000, com uma representatividade de *index* semelhantes e cobertura maior ou igual a 20 por base. Como tal, procedeu-se à classificação das variantes encontradas.

A variante dos casos positivos anteriormente referidos, do caso *index* e da progenitora sequenciados por Sanger, foi classificada como patogénica segundo os critérios da ACMG (que se enquadrou nos critérios PM2<sub>sup</sub>, PVS1, PP5).

Quanto aos resultados de NGS nas amostras negativas, selecionadas dos painéis, apenas em 7/12 amostras foram encontradas variantes. Destas, foram encontradas 28 variantes no total, sendo que após filtragem sobraram 11 variantes. Das 17 variantes descartadas, 7 situavam-se na zona intrónica, das quais, 5 encontravam-se na região da ligação dos *primers* (Amostra 1, Tabela 8).

Ainda é de notar que 4/7 amostras com variantes encontradas, tinham as variantes c.2667\_2669delGGA e c2341G>A em comum, mesmo antes de filtragem, sendo a primeira classificada como benigna (com BA1 segundo os critérios ACMG) e a segunda excluída após filtragem. Além disso, uma destas amostras, para além destas duas variantes, também apresentava outras. Ainda, foram encontradas outras duas variantes, que eram comuns entre

2/7 amostras, a c.2223G>A e c.1754-103 C>T, sendo as duas excluídas após filtragem e a última pertencer a uma região intrónica (Tabela 8).

Quanto aos resultados de NGS nas 3 amostras negativas, anteriormente testadas por Sanger, não foi encontrado nenhuma variante num dos pacientes. Nos outros dois, foram encontradas 8 variantes no total, mas após filtrações apenas sobraram 3. Nenhuma destas variantes apresentaram significância clínica, sendo as mesmas classificadas como benignas ou provavelmente benignas (Tabela 9).

Tabela 8- Amostras com variantes encontradas após sequenciação de ORF15 do gene RPGR

Amostras	Variantes	Filtragem
Amostra 1	c.1754-237A>C	X
	c.1754-239delA	X
	c.1754-248_1754-242delAGAATCA	X
	c.1754-252_1754-251insCATGG	X
	c.1754-253G>T	X
Amostra 2	c.3430G>A	X
	c.3396C>T	X
	c.2820_2840dupAGGGGAGGATGGAGAAGGGGA	Pass
Amostra 3	c.2667_2669delGGA	Pass
	c.2341G>A	X
Amostra 4	c.2667_2669delGGA	Pass
	c.2341G>A	X
Amostra 5	c.2667_2669delGGA	Pass
	c.2341G>A	X
Amostra 6	c.2667_2669delGGA	Pass
	c.2341G>A	X
	c.2517A>G	Pass
	c.2606_2620delAAGAAGGGGAGGAAG	Pass
	c.3231T>A	Pass
	c.3074_3085delTGGAAGGGGAGG	Pass
	c.2223G>A	X
c.1754-103C>T	X	
Amostra 7	c.2223G>A	X
	c.1754-103C>T	X
	c.2919_2939dupAGGGGAGGAAGGAGAAGGGGA	Pass
	c.2541_2561delGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGG	Pass
	c.3264G>A	X
c.3219C>T	X	

As variantes presentes em múltiplas amostras estão de uma cor distinta; X- variantes que foram excluídas durante a filtragem; Pass- variantes que permaneceram após filtragem;

Tabela 9- Classificação das variantes encontradas por NGS, nos casos negativos de Sanger, após filtragem de variantes pela Alissa

Amostras	Género	Zigotia	Variante	Efeito	Class
Amostra 5	M	Homozigótico	c.2667_2669delGGA	<i>Inframe</i>	B
Amostra 7	M	Homozigótico	c.2919_2939dupAGGGGAGGAAGGAGAAGGGGA	<i>Inframe</i>	PB
		Homozigótico	c.2541_2561delGGAGGGGAAGAGGAGGAAGG	<i>Inframe</i>	B

Amarelo- variante em comum com três amostras retiradas dos painéis; Class- classificação; M-masculino; F-feminino; B-benigno; PB- provavelmente benigno;

Quanto às amostras negativas retiradas dos painéis 4 amostras, não apresentaram variantes e uma amostra apresentava 5 variantes, no entanto todas estas foram filtradas por estarem localizados fora da região perto da ligação dos *primers*. A filtragem resultou em 8 variantes encontradas, que foram classificadas como benignas ou provavelmente benignas (Tabela 10).

Tabela 10- Classificação das variantes encontradas após filtragem de variantes utilizando a Alissa das amostras selecionadas a partir dos casos negativos dos painéis

Amostras	Género	Zigotia	Variante	Efeito	Class
Amostra 2	M	Hemizigótico	c.2820_2840dupAGGGGAGGATGGAGAAGGGGA	<i>Inframe</i>	B
Amostra 3	F	Homozigótico	c.2667_2669delGGA	<i>Inframe</i>	B
Amostra 4	M	Hemizigótico	c.2667_2669delGGA	<i>Inframe</i>	B
Amostra 6	F	Heterozigótico	c.2667_2669delGGA	<i>Inframe</i>	B
		Heterozigótico	c.2517A>G	sinônimo	PB
		Heterozigótico	c.2606_2620delAAGAAGGGGAGGAAG	<i>Inframe</i>	PB
		Heterozigótico	c.3231T>A	Não sinônimo	B
		Heterozigótico	c.3074_3085delTGGAAGGGGAGG	<i>Inframe</i>	B

Amarelo- variante em comum em três destas amostras e com uma amostra dos casos negativos de Sanger; Class- classificação; M-masculino; F-feminino; B-benigno; PB- provavelmente benigno;

Nos Anexo 2 e Anexo 3, encontram-se os critérios que permitiram chegar a uma classificação nestas variantes que foram filtradas por Alissa.

#### 4 Discussão

Quanto à compilação dos resultados dos painéis, a doença hereditária mais prevalente é a retinite pigmentosa e que as variantes principalmente associadas à doença da retina são *ABCA4*, *EYS* e *USH2A*, o que confirma os resultados de outros artigos [3, 36]. Apesar de *RPGR* não fazer parte destes genes principais, isto pode ser devido à não sequenciação da região ORF15 do gene nos painéis, já que este é causador da grande parte de retinite pigmentosa ligada ao X [8,12,13,14].

Ainda é de referir ainda que na compilação dos resultados dos painéis, a maioria dos genes associadas a doenças hereditárias da retina, aparecem com frequência <1 %, alinhando-se com os resultados de outros estudos [3, 36]. Por esse motivo, apenas nos genes *ABCA4*, *EYS* e *USH2A* foi possível fazer a caracterização fenotípica, por haver uma maior frequência de indivíduos com mutações nestes genes e, conseqüentemente, um conjunto maior de informação clínica disponível. No entanto, ainda assim, houve indivíduos, onde a informação clínica era muito limitada.

Em estudos futuros, seria benéfico obter um conjunto mais abrangente de informações clínicas dos pacientes, permitindo, desta forma, aumentar a caracterização fenotípica dos indivíduos e estabelecer correlações genotípicas significativas. Uma informação clínica mais alargada, ainda irá permitir a melhor seleção de indivíduos para testes genéticos, a seleção de tratamentos adequados, a avaliação da eficácia terapêutica e a facilitação da classificação de variantes (como por exemplo, a informação sobre a segregação faz parte a um dos critérios da ACMG para classificação de variantes). Em relação ao gene *RPGR*, mutações em ORF15 estão associados a um grau de miopia mais severa. Isto, pode ser um indicador para a realização de testes genéticos para essa região e, possivelmente, indicar a severidade e progressão mais rápida da doença e, conseqüentemente, uma menor janela terapêutica, sendo a sua implementação necessária o mais cedo possível [37].

Na sequenciação do ORF15 do gene *RPGR*, os novos *primers* desenhados, a utilização do de *amplicon based enrichment* e condições de PCR específicos, permitiram aumentar a sensibilidade e precisão do teste. Apesar dos resultados das amostras, previamente negativos, terem permanecido negativos, nas amostras positivas, as variantes patogénicas foram corretamente identificadas pelo novo método desenvolvido, mostrando que esta região foi sequenciada com sucesso, facilitando e permitindo que este teste seja implementado no laboratório.

A razão dos primers RPGR\_15\_NEID não terem apresentado amplificação, pode ter sido porque as enzimas utilizadas no artigo da qual os primers foram retirados, foram diferentes (HotfireTaq ou HotstarTaq Polymerase) [46]. Para além disso, outro estudo usou também estes primers para realizar confirmação por Sanger, onde 15% das amplificações falharam [44].

Os *primers* do artigo, da qual os *primers* RPGR\_15\_LI foram baseados [34], foram também utilizados por outros estudos para resolver problemas na sequenciação do ORF15 no gene *RPGR*. [35,36,44]

Apesar de tanto o laboratório, quanto o artigo que originou os primers PRGR\_15\_LI [34], terem utilizado a mesma enzima e primers, o programa de PCR utilizados diferem das condições de PCR recomendadas pela bula da enzima (TAKARA LA Taq Hot Start) [47]. Isto mostra que, pode existir variabilidade nos programas de PCR, sem necessariamente resultar em grandes alterações na qualidade dos resultados. Cada laboratório deve otimizar o programa de PCR de acordo com as suas próprias necessidades e com base nas recomendações do fabricante do material utilizado [48].

Ainda não foi realizada uma otimização para sequenciação de ORF15 por Sanger pelo laboratório, já que é uma região difícil de sequenciar e como são necessárias várias tentativas, foi decidido otimizar primeiramente a sequenciação por NGS. Eventualmente para confirmar resultados, irá ser necessário sequenciar por Sanger, devendo este, ser otimizado em estudos futuros, seja com os mesmos primers utilizados em NGS ou outros primers e enzimas utilizados por outros artigos [36,45,49]. Entretanto, no laboratório, para a confirmação de resultados positivos, é ainda utilizado os *primers* já desenhados para Sanger, anteriormente referidos, com qual as variantes c.3178\_3179del foram identificadas primeiro, apesar de esta, ainda apresentar as limitações anteriormente referidas, como a necessidade de várias repetições do teste.

Existem ainda outros métodos e equipamentos de sequenciação que conseguiram sequenciar ORF15 com sucesso, como *nanopore sequencing/long read sequencig* usando MinION (Oxford nanopore technologies) ou Sequel (PacBio) [45,50]. Apesar de nestes métodos não ser necessário a realização da fragmentação para a preparação da biblioteca para sequenciação, necessita ainda da realização de um PCR inicial para amplificação da região alvo. Durante o PCR pode haver deslizamento da polimerase ou amplificação tendenciosa (no caso do género feminino) [45] e por estas razões, estão a ser desenvolvidas outras estratégias para *long read sequencing* que evitam esta etapa de PCR, como por exemplo, através do uso de CRISPR/Cas9 para a clivagem e isolamento da região alvo [50,51].

No que diz respeito ao selecionamento de indivíduos para testagem, pode ser vantajoso testar para a região ORF15 (em *Multiplex*), em simultâneo com os painéis, em casos de retinopatias hereditárias ou mesmo testar para ORF15 em simultâneo com testes direcionados apenas para o gene *RPGR* em específico (casos de XLRP).

No entanto, os nossos resultados não demonstram esta vantagem, dado que os resultados negativos testados, permaneceram negativos. É de notar que apenas foram testadas 12 amostras negativas, sendo que seria necessário um estudo mais alargado para concluir se seria benéfico realizar este teste em simultâneo com outros estudos ou após outros testes terem resultados negativos.

Foi sugerido anteriormente que a sequenciação de ORF15 do gene *RPGR* seja realizada como primeira abordagem em casos de XLRP, seguida pela sequenciação de *RP2* e posteriormente das outras regiões de *RPGR* [46]. Além disso, outras abordagens também podem ser realizadas, como a realização da sequenciação por WES e painéis, onde, as regiões com cobertura insuficiente, como em ORF15, são complementadas com sequenciação por Sanger [49].

No que diz respeito aos tratamentos para as doenças hereditárias da retina, a expansão dos testes genéticos para a região ORF15 pode ampliar as opções de tratamento, abrindo portas para o desenvolvimento de terapias genéticas, para além da terapêutica já existentes, como terapia celular, tratamento com fatores neurotróficos (que confere proteção neural), terapias com células estaminais ou implantes retiniais [3]. Um exemplo específico de tratamento genético, que está atualmente em desenvolvimento para indivíduos com mutações em ORF15 é a edição genética com a tecnologia CRISPR/Cas9, usando como vetores, o vírus adeno-associado [37,52,53]. Entretanto, é importante considerar que devido à natureza da região, altamente repetitiva e rica em purinas, ORF15 é menos estável e mais propensa a mutações espontâneas durante a clonagem de vetores virais [52]. Isso pode ser abordado através da otimização do codão, ou seja, modificando os nucleótidos sem alterar o codão. Isso permite ajustar a quantidade de certos nucleótidos, reduzir sequências repetitivas e outras regiões que possam interferir na clonagem [52]. Adicionalmente, para além da técnica CRISPR/Cas9, que pode apresentar efeitos fora do alvo desejado (*off-target*) e eficiência variada, também existem outros métodos recentemente estudados como "prime editing", que consiste na combinação de Cas9 com *reverse transcriptase mediated DNA synthesis* [37].

Ainda mais estudos serão necessários para compreender a função do *RPGR*<sup>ORF15</sup> e as interações proteicas existentes na região ORF15, o que irá permitir não só explicar e caracterizar melhor

fenotipicamente as doenças associadas, bem como, desenvolver tratamentos que têm como alvo estas interações e mecanismos em que o *RPGR* participa.

## **5 Conclusão**

Em conclusão, ao otimizar a sequenciação de ORF15 do gene *RPGR*, por meio de desenho de *primers*, definição de condições de PCR específicos e o uso de *amplicon based enrichment*, o laboratório conseguiu sequenciar esta região com sucesso, conseguindo obter uma cobertura média de 1196 leituras e permitindo assim, implementá-la no laboratório. A sequenciação desta região oferece uma testagem mais ampla aos clientes nas retinopatias hereditárias. Este teste irá ser útil para detecção de mutações patogénicas causadoras de retinite pigmentosa e outras doenças hereditárias da retina, bem como permitir a classificação/reclassificação de variantes, melhor caracterização de doenças e desenvolver novas terapias genéticas.

## Referências Bibliográficas

- 1- Ratra, D., Ozdek, S., Raviselvan, M., Elchuri, S., & Sharma, T. (2022). Approach to inherited retinal diseases. *Indian journal of ophthalmology*, 70(7), 2305–2315. [https://doi.org/10.4103/ijo.IJO\\_314\\_22](https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_314_22)
- 2- Ben-Yosef T. (2022). Inherited Retinal Diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 13467. <https://doi.org/10.3390/ijms232113467>
- 3- Schneider, N., Sundaresan, Y., Gopalakrishnan, P., Beryozkin, A., Hanany, M., Levanon, E. Y., Banin, E., Ben-Aroya, S., & Sharon, D. (2022). Inherited retinal diseases: Linking genes, disease-causing variants, and relevant therapeutic modalities. *Progress in retinal and eye research*, 89, 101029. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.101029>
- 4- Wang, Y., Lu, L., Zhang, D., Tan, Y., Li, D., He, F., Jiao, X., Yang, M., Hejtmancik, J. F., & Liu, X. (2021). A novel mutation of the RPGR gene in a Chinese X-linked retinitis pigmentosa family and possible involvement of X-chromosome inactivation. *Eye (London, England)*, 35(6), 1688–1696. <https://doi.org/10.1038/s41433-020-01150-0>
- 5- Riaz, M., & Baird, P. N. (2016). Genetics in Retinal Diseases. *Developments in ophthalmology*, 55, 57–62. <https://doi.org/10.1159/000431142>
- 6- Dockery, A., Whelan, L., Humphries, P., & Farrar, G. J. (2021). Next-Generation Sequencing Applications for Inherited Retinal Diseases. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5684. <https://doi.org/10.3390/ijms22115684>
- 7- Birtel, J., Yusuf, I. H., Priglinger, C., Rudolph, G., & Charbel Issa, P. (2021). Diagnosis of Inherited Retinal Diseases. *Diagnose erblicher Netzhauterkrankungen. Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 238(3), 249–259. <https://doi.org/10.1055/a-1388-7236>
- 8- O'Hare, F., Edwards, T. L., Hu, M. L., Hickey, D. G., Zhang, A. C., Wang, J. H., Liu, Z., & Ayton, L. N. (2021). An optometrist's guide to the top candidate inherited retinal diseases for gene therapy. *Clinical & experimental optometry*, 104(4), 431–443. <https://doi.org/10.1080/08164622.2021.1878851>
- 9- Sajovic, J., Meglič, A., Glavač, D., Markelj, Š., Hawlina, M., & Fakin, A. (2022). The Role of Vitamin A in Retinal Diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1014. <https://doi.org/10.3390/ijms23031014>
- 10- Hu, M. L., Edwards, T. L., O'Hare, F., Hickey, D. G., Wang, J. H., Liu, Z., & Ayton, L. N. (2021). Gene therapy for inherited retinal diseases: progress and possibilities. *Clinical &*

experimental optometry, 104(4), 444–454.  
<https://doi.org/10.1080/08164622.2021.1880863>

- 11- Méjécase, C., Malka, S., Guan, Z., Slater, A., Arno, G., & Moosajee, M. (2020). Practical guide to genetic screening for inherited eye diseases. *Therapeutic advances in ophthalmology*, 12, 2515841420954592.  
<https://doi.org/10.1177/2515841420954592>
- 12- Lyraki, R., Megaw, R., & Hurd, T. (2016). Disease mechanisms of X-linked retinitis pigmentosa due to RP2 and RPGR mutations. *Biochemical Society transactions*, 44(5), 1235–1244. <https://doi.org/10.1042/BST20160148>
- 13- Georgiou, M., Fujinami, K., & Michaelides, M. (2021). Inherited retinal diseases: Therapeutics, clinical trials and end points—A review. *Clinical & experimental ophthalmology*, 49(3), 270–288. <https://doi.org/10.1111/ceo.13917>
- 14- Perea-Romero, I., Gordo, G., Iancu, I. F., Del Pozo-Valero, M., Almoguera, B., Blanco-Kelly, F., Carreño, E., Jimenez-Rolando, B., Lopez-Rodriguez, R., Lorda-Sanchez, I., Martin-Merida, I., Pérez de Ayala, L., Riveiro-Alvarez, R., Rodriguez-Pinilla, E., Tahsin-Swafiri, S., Trujillo-Tiebas, M. J., ESRETNET Study Group, ERDC Study Group, Associated Clinical Study Group, Garcia-Sandoval, B., ... Ayuso, C. (2021). Genetic landscape of 6089 inherited retinal dystrophies affected cases in Spain and their therapeutic and extended epidemiological implications. *Scientific reports*, 11(1), 1526.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-81093-y>
- 15- De Silva, S. R., Arno, G., Robson, A. G., Fakin, A., Pontikos, N., Mohamed, M. D., Bird, A. C., Moore, A. T., Michaelides, M., Webster, A. R., & Mahroo, O. A. (2021). The X-linked retinopathies: Physiological insights, pathogenic mechanisms, phenotypic features and novel therapies. *Progress in retinal and eye research*, 82, 100898.  
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2020.100898>
- 16- RetNet - Retinal Information Network. (n.d.). <https://web.sph.uth.edu/RetNet/>
- 17- Fahim, A. T., Daiger, S. P., & Weleber, R. G. (2000). Nonsyndromic Retinitis Pigmentosa Overview. In M. P. Adam (Eds.) et. al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- 18- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2012). *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. Saunders.
- 19- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Saunders.

- 20- Khanna H. (2018). More Than Meets the Eye: Current Understanding of RPGR Function. *Advances in experimental medicine and biology*, 1074, 521–538. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4\\_64](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_64)
- 21- Bachmann-Gagescu, R., & Neuhauss, S. C. (2019). The photoreceptor cilium and its diseases. *Current opinion in genetics & development*, 56, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.05.004>
- 22- Wensel, T. G., Potter, V. L., Moye, A., Zhang, Z., & Robichaux, M. A. (2021). Structure and dynamics of photoreceptor sensory cilia. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 473(9), 1517–1537. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02564-9>
- 23- Malhotra, H., Barnes, C. L., & Calvert, P. D. (2021). Functional compartmentalization of photoreceptor neurons. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 473(9), 1493–1516. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02558-7>
- 24- Vetter, M., Wang, J., Lorentzen, E., & Deretic, D. (2015). Novel topography of the Rab11-effector interaction network within a ciliary membrane targeting complex. *Small GTPases*, 6(4), 165–173. <https://doi.org/10.1080/21541248.2015.1091539>
- 25- Sung, C. H., & Leroux, M. R. (2013). The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking. *Nature cell biology*, 15(12), 1387–1397. <https://doi.org/10.1038/ncb2888>
- 26- Pedersen, L. B., Mogensen, J. B., & Christensen, S. T. (2016). Endocytic Control of Cellular Signaling at the Primary Cilium. *Trends in biochemical sciences*, 41(9), 784–797. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.06.002>
- 27- Deretic, D., & Wang, J. (2012). Molecular assemblies that control rhodopsin transport to the cilia. *Vision research*, 75, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2012.07.015>
- 28- Sánchez-Bellver, L., Toulis, V., & Marfany, G. (2021). On the Wrong Track: Alterations of Ciliary Transport in Inherited Retinal Dystrophies. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 623734. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.623734>
- 29- Megaw, R. D., Soares, D. C., & Wright, A. F. (2015). RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Experimental eye research*, 138, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.007>
- 30- He, S., Parapuram, S. K., Hurd, T. W., Behnam, B., Margolis, B., Swaroop, A., & Khanna, H. (2008). Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) protein isoforms in mammalian retina: insights into X-linked Retinitis Pigmentosa and associated

- ciliopathies. *Vision research*, 48(3), 366–376.  
<https://doi.org/10.1016/j.visres.2007.08.005>
- 31- Wright, R. N., Hong, D. H., & Perkins, B. (2011). Misexpression of the constitutive Rpgr(ex1-19) variant leads to severe photoreceptor degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(8), 5189–5201. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7470>
- 32- Cehajic-Kapetanovic, J., Martinez-Fernandez de la Camara, C., Birtel, J., Rehman, S., McClements, M. E., Charbel Issa, P., Lotery, A. J., & MacLaren, R. E. (2022). Impaired glutamylation of RPGRORF15 underlies the cone-dominated phenotype associated with truncating distal ORF15 variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(49), e2208707119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2208707119>
- 33- Yang, J., Zhou, L., Ouyang, J., Xiao, X., Sun, W., Li, S., & Zhang, Q. (2021). Genotype-Phenotype Analysis of RPGR Variations: Reporting of 62 Chinese Families and a Literature Review. *Frontiers in genetics*, 12, 600210. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.600210>
- 34- Li, J., Tang, J., Feng, Y., Xu, M., Chen, R., Zou, X., Sui, R., Chang, E. Y., Lewis, R. A., Zhang, V. W., Wang, J., & Wong, L. C. (2016). Improved Diagnosis of Inherited Retinal Dystrophies by High-Fidelity PCR of ORF15 followed by Next-Generation Sequencing. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*, 18(6), 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.06.007>
- 35- Zou, X., Fang, S., Wu, S., Li, H., Sun, Z., Zhu, T., Wei, X., & Sui, R. (2020). Detailed comparison of phenotype between male patients carrying variants in exons 1-14 and ORF15 of RPGR. *Experimental eye research*, 198, 108147. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108147>
- 36- Tuupanen, S., Gall, K., Sistonen, J., Saarinen, I., Kämpjärvi, K., Wells, K., Merkkiniemi, K., von Nandelstadh, P., Sarantaus, L., Käsäkoski, J., Mårtenson, E., Västinsalo, H., Schleit, J., Sankila, E. M., Kere, A., Junnila, H., Siivonen, P., Andreevskaya, M., Kytölä, V., Muona, M., ... Alastalo, T. P. (2022). Prevalence of RPGR-Mediated Retinal Dystrophy in an Unselected Cohort of Over 5000 Patients. *Translational vision science & technology*, 11(1), 6. <https://doi.org/10.1167/tvst.11.1.6>

- 37-Talib, M., & Boon, C. J. F. (2020). Retinal Dystrophies and the Road to Treatment: Clinical Requirements and Considerations. *Asia-Pacific journal of ophthalmology* (Philadelphia, Pa.), 9(3), 159–179. <https://doi.org/10.1097/APO.0000000000000290>
- 38- Nassisi, M., De Bartolo, G., Mohand-Said, S., Condroyer, C., Antonio, A., Lancelot, M. E., Bujakowska, K., Smirnov, V., Pugliese, T., Neidhardt, J., Sahel, J. A., Zeitz, C., & Audo, I. (2022). Retrospective Natural History Study of RPGR-Related Cone- and Cone-Rod Dystrophies While Expanding the Mutation Spectrum of the Disease. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7189. <https://doi.org/10.3390/ijms23137189>
- 39- Talib, M., van Schooneveld, M. J., Van Cauwenbergh, C., Wijnholds, J., Ten Brink, J. B., Florijn, R. J., Schalijs-Delfos, N. E., Dagnelie, G., van Genderen, M. M., De Baere, E., Meester-Smoor, M. A., De Zaeytijd, J., Cremers, F. P. M., van den Born, L. I., Thiadens, A. A., Hoyng, C. B., Klaver, C. C., Leroy, B. P., Bergen, A. A., & Boon, C. J. F. (2018). The Spectrum of Structural and Functional Abnormalities in Female Carriers of Pathogenic Variants in the RPGR Gene. *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(10), 4123–4133. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23453>
- 40- Beigi, F., Del Pozo-Valero, M., Martin-Merida, I., Manaviat, M. R., Ayuso, C., & Ghasemi, N. (2021). Homozygous females for a X-linked RPGR-ORF15 mutation in an Iranian family with retinitis pigmentosa. *Experimental eye research*, 211, 108714. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108714>
- 41- Kousal, B., Skalicka, P., Valesova, L., Fletcher, T., Hart-Holden, N., O'Grady, A., Chakarova, C. F., Michaelides, M., Hardcastle, A. J., & Liskova, P. (2014). Severe retinal degeneration in women with a c.2543del mutation in ORF15 of the RPGR gene. *Molecular vision*, 20, 1307–1317.
- 42- Tuekprakhon, A., Pawestri, A. R., Suvannaboon, R., Thongyou, K., Trinavarat, A., & Atchaneeyasakul, L. O. (2021). Rare Co-Occurrence of Visual Snow in a Female Carrier With RPGRORF15-Associated Retinal Disorder. *Frontiers in genetics*, 12, 728085. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728085>
- 43- Targeted Sequencing Approaches for NGS | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/targeted-sequencing-approaches.html>

- 44- Maggi, J., Roberts, L., Koller, S., Rebello, G., Berger, W., & Ramesar, R. (2020). De Novo Assembly-Based Analysis of RPGR Exon ORF15 in an Indigenous African Cohort Overcomes Limitations of a Standard Next-Generation Sequencing (NGS) Data Analysis Pipeline. *Genes*, 11(7), 800. <https://doi.org/10.3390/genes11070800>
- 45- Yahya, S., Watson, C. M., Carr, I., McKibbin, M., Crinnion, L. A., Taylor, M., Bonin, H., Fletcher, T., El-Asrag, M. E., Ali, M., Toomes, C., & Inglehearn, C. F. (2023). Long-Read Nanopore Sequencing of RPGR ORF15 is Enhanced Following DNase I Treatment of MinION Flow Cells. *Molecular diagnosis & therapy*, 27(4), 525–535. <https://doi.org/10.1007/s40291-023-00656-z>
- 46- Neidhardt, J., Glaus, E., Lorenz, B., Netzer, C., Li, Y., Schambeck, M., Wittmer, M., Feil, S., Kirschner-Schwabe, R., Rosenberg, T., Cremers, F. P., Bergen, A. A., Barthelmes, D., Baraki, H., Schmid, F., Tanner, G., Fleischhauer, J., Orth, U., Becker, C., Wegscheider, E., ... Berger, W. (2008). Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing. *Molecular vision*, 14, 1081–1093.
- 47-LA Taq DNA polymerase, hot-start version. (n.d.-b). <https://www.takarabio.com/products/pcr/long-range-pcr/la-taq-products/la-taq-dna-polymerase-hs?catalog=RR042A>
- 48- Optimizing your PCR. (n.d.). <https://www.takarabio.com/learning-centers/pcr/faq/optimization>
- 49- Huang, X. F., Wu, J., Lv, J. N., Zhang, X., & Jin, Z. B. (2015). Identification of false-negative mutations missed by next-generation sequencing in retinitis pigmentosa patients: a complementary approach to clinical genetic diagnostic testing. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(4), 307–311. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.193>
- 50- Miller, D. E., Sulovari, A., Wang, T., Loucks, H., Hoekzema, K., Munson, K. M., Lewis, A. P., Fuerte, E. P. A., Paschal, C. R., Walsh, T., Thies, J., Bennett, J. T., Glass, I., Dipple, K. M., Patterson, K., Bonkowski, E. S., Nelson, Z., Squire, A., Sikes, M., Beckman, E., ... Eichler, E. E. (2021). Targeted long-read sequencing identifies missing disease-causing variation. *American journal of human genetics*, 108(8), 1436–1449. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.06.006>

- 51- Gilpatrick, T., Lee, I., Graham, J. E., Raimondeau, E., Bowen, R., Heron, A., Downs, B., Sukumar, S., Sedlazeck, F. J., & Timp, W. (2020). Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. *Nature biotechnology*, 38(4), 433–438. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0407-5>
- 52- Martinez-Fernandez De La Camara, C., Nanda, A., Salvetti, A. P., Fischer, M. D., & MacLaren, R. E. (2018). Gene therapy for the treatment of X-linked retinitis pigmentosa. *Expert opinion on orphan drugs*, 6(3), 167–177. <https://doi.org/10.1080/21678707.2018.1444476>
- 53- Gumerson, J. D., Alsufyani, A., Yu, W., Lei, J., Sun, X., Dong, L., Wu, Z., & Li, T. (2022). Restoration of RPGR expression in vivo using CRISPR/Cas9 gene editing. *Gene therapy*, 29(1-2), 81–93. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00258-6>

## Anexos

GENES	Número	GENES	Número	GENES	Número	GENES	Número
IQCB1	1	RP1	31	BBS1	61	ZNF513	91
EYS	2	MAK	32	EFEMP1	62	CYP4V2	92
RDH5	3	CERKL	33	NRL	63	ARSG	93
COL18A1	4	OPN1LW	34	WHRN	64	KLHL7	94
CNGB3	5	GUCY2D	35	CNNM4	65	IMPDH1	95
PRPH2	6	PDE6B	36	AHI1	66	SAG	96
ABCA4	7	ADGRV1	37	FSCN2	67	RP2	97
USH2A	8	KCNV2	38	HGSNAT	68	Resultados:	Número
RS1	9	CACNA2D4	39	MERTK	69	Negativo	0
BEST1	10	IMPG2	40	PRPF8	70	Positivo	1
CEP290	11	TOPORS	41	TRPM1	71	Genero	Número
CDH23	12	SLC24A1	42	dup(16)(p11.2)	72	Masculino	0
PRPF31	13	PCDH15	43	LRP5	73	Feminino	1
CDHR1	14	ADAM9	44	CNGA1	74	Gene ass.RP	
WDR19	15	PDE6A	45	PCARE	75	0- não	
BBS2	16	RHO	46	POC1B	76	1- sim	
RPGR	17	P83	47	PDE6C	77	Região	Número
RBP4	18	RIMS1	48	SLC38A8	78	Saudi	0
NPHP1	19	LRAT	49	IFT140	79	Coimbra	1
CNGB1	20	AGBL5	50	TULP1	80	Lisboa	2
CNGA3	21	RP1L1	51	NMNAT1	81	Porto	3
CDH3	22	ABHD12	52	PRPF6	82	Braga	4
AIPL1	23	ATF6	53	ROM1	83	Espanha	5
KIAA1549	24	CRB1	54	LCA5	84	Açores	6
MYO7A	25	CHM	55	SNRN200	85	Uruguay	7
OAT	26	PRPF4	56	HK1	86	Douro	8
IMPG1	27	RPGRIP1	57	SPATA7	87	Classificação Var	Número
NR2E3	28	ARL2BP	58	CLN3	88	P	1
RDH12	29	CRX	59	SEMA4A	89	Prov.P	2
RPE65	30	HMCN1	60	ALMS1	90	VUS	3

Anexo 1- Conversão no Excel, dos dados para dados numéricos para usar no SPSS (apenas aceita dados numéricos); P- patogénico; Prov.P- provavelmente patogénico; VUS- variante de significado incerto; Classificação Var- corresponde as variantes encontradas e sua classificação; Gene ass.RP- genes associados à retinite pigmentosa;

Amostra 1 Masculino							
Início	Fim	Variantes	Tipo	Efeito	Proteína	Class	Critérios
38146735	38146735	c.1754-237A>C	SNP	-	-	-	encontra se antes do local de ligação do primer e fora do exão
38146737	38146737	c.1754-239delA	Deleção	-	-	-	encontra se antes do local de ligação do primer e fora do exão
38146740	38146746	c.1754-248_1754-249delAGCAATCA	Deleção	-	-	-	encontra se antes do local de ligação do primer e fora do exão
38146749	38146749	c.1754-252_1754-251insCATGG	Inserção	-	-	-	encontra se antes do local de ligação do primer e fora do exão
38146751	38146751	c.1754-253G>T	SNP	-	-	-	encontra se antes do local de ligação do primer e fora do exão
Amostra 2 Masculino							
Início	Fim	Variantes	Tipo	Efeito	Proteína	Class	Critérios
38144822	38144822	c.3430G>A	snp	nonsynonymous	p.V1144I	B	BA1- gnomad frequencia populacional total 13.46% (>5%); BP6-classificado na clinvar como benigno com 4 submissões, a ultima em 2022, ID:403388 . BA1 logo é benigno
38144856	38144856	c.3396C>T	snp	synonymous	p.N1132=	B	BA1- frequencia populacional 16.13% (>5%); BP6- classificado na gnomad como benigno, com 4 submissões, a ultima em 2022, ID:143091; BA1 logo classificado como benigno.
38145411	38145411	c.2820_2840dupAGGGGAGGATG GAGAAGGGGA	insertion	inframe	p.D943_E949dup	B	BP6- classificado como benigno na clinvar, com 3 submissões, a ultima em 2022, ID: 1267917; BS1- Dados populacionais totais 2.9% (>0.1%) na gnomad e BS2- encontrado em gupos controlo, 28 homens e 91 mulheres em homozigotia.BP4- uma deup inframe numa regio repetitiva sem função conhecida; BP6, BS1, BS2; >2BS logo Benigno
Amostra 3 Feminino							
Início	Fim	Variantes	Tipo	Efeito	Proteína	Class	Critérios
38145583	38145585	c.2667_2669delGGA	deletion	inframe	p.E890del	B	BA1- total 9% (>5%) e BS2- presente em grupos controlo saudáveis, 1 homem e 61 mulheres em homozigotia; classificada como benigna/provavelmente benigna na clinvar ID: 257196; BP3- deleção inframe numa regio repetitiva sem função especifica conhecida. BA1, logo Benigno
38145911	38145911	c.2341G>A	snp	nonsynonymous	p.A781T	B	BA1- total 12.92% (>5%) ; BS2- encontradao em gupos controlo de individuos saudáveis em 209 homens e 93 mulheres em homozigotia.; BP6- classificado na clinvar como benigna, 4 submissões, a ultima em 2022, ID: 257193; BA1, BS2, BP6; classificada como benigna (BA1)
Amostra 4 Masculino							
Início	Fim	Variantes	Tipo	Efeito	Proteína	Class	Critérios
38145583	38145585	c.2667_2669delGGA	deletion	inframe	p.E890del	B	BA1- total 9% (>5%) ; BS2- presente em grupos controlo saudáveis, 1 homem e 61 mulheres em homozigotia; classificada como benigna/provavelmente benigna na clinvar ID: 257196; BP3- deleção inframe numa regio repetitiva sem função especifica conhecida. BA1, logo Benigno
38145911	38145911	c.2341G>A	snp	nonsynonymous	p.A781T	B	BA1- total 12.92% (>5%) ; BS2- encontradao em gupos controlo de individuos saudáveis em 209 homens e 93 mulheres em homozigotia.; BP6- classificado na clinvar como benigna, 4 submissões, a ultima em 2022, ID: 257193; BA1, BS2, BP6; classificada como benigna (BA1)
Amostra 5 Masculino							
Início	Fim	Variantes	Tipo	Efeito	Proteína	Class	Critérios
38145583	38145585	c.2667_2669delGGA	deletion	inframe	p.E890del	B	BS1: All 1.6129% (720); African 2.5753% (77); Latino 1.1092% (115); Ashkenazi Jewish 1.7031% (39); East Asian 0% (0); South Asian 0.54564% (37); Eur. (Non-Finnish) 2.7044% (387); Eur. (Finnish) 1.019% (29); Other 2.7885% (36); 720 het, 52 hom, 65 hemi (XLR) BP6: ClinVar ID: 257196, 4x, Benign/Likely benign BP4: No NM da HGMD é numa região intrónica, sem impacto no splicing BP3? n/a HGMD PMID: 32679846 - "RPGR exon ORF15 variants are one of the most frequent causes for inherited retinal disorders (IRDs), in particular retinitis pigmentosa." presente em doentes com retinite pigmentosa, classificada como benigna PMID: 18552978 - Polymorphic sequence variations PMID: 27620828- benigno em 11 casos; ? BA1- encontrado numa alta frequencia alelica populacional total >5% e BS2 foi encontrado 8 mulheres em honozigotia e um homem em hemizigota todos saudáveis num grupo controlo; BS1; BP6; BS2; ou seja >2BS logo é benigno.
38145911	38145911	c.2341G>A	snp	nonsynonymous	p.A781T	B	BP6 clinvar classificado como benigno, com 4 submissões, o ultimo em 20221, ID: 257193; BA1- na base de dados populacionais totais, a frfrequencia >5%. Stand alone logo Benigno.

Anexo 2- Classificação das variantes encontradas segundo os critérios da ACMG. Azul-corresponde as variantes que permaneceram após a aplicação dos filtros referidos na Alissa Interpret. Class- corresponde á classificação final da variante; B-benigno; PB-provavelmente benigno.

Amostra 6 Feminino							
Início	Fim	Variantes	Tipo	Efeito	Proteína	Class	Critérios
38145021	38145021	c.3231T>A	snp	nonsynonymous	p.N1077K	B	BP6- clinvar: likely benign, 3 submissões, última submissão em 2022, ID: 403392; BS1- frequência alelica alta (>0.1%) em dados populacionais segundo Sherloc criteria (doi:10.1038/gim.2017.37); Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) 0.01897/NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server 0.01970 /The Genome Aggregation Database (gnomAD), exomes 0.01927 /The Genome Aggregation Database (gnomAD) 0.02044 /Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) 0.02145/ 1000 Genomes Project 0.00901/ Exome Aggregation Consortium (EXAC) 0.01969/ The Genome Aggregation Database (gnomAD) 0.02112; BP1- é uma variante missense, sendo que na região orf15, este gene é conhecido por causar doença através de variantes truncantes e nonsense (out of frame e stop). BP4:metodos preditivos computacionais: SIFT SCORE: 0,668 tolerated; PolyPhen: This mutation is predicted to be BENIGN with a score of 0.012 (sensitivity: 0.96; specificity: 0.78); BS2 encontrado em homozigotia e hemizigotia na população normal: Number of homozygotes 34, Number of hemizygotes 1457, em controles-> homozigotia 12 e hemizigotia 553: BP6, BS1, BP1, BP4, BS2 ou seja >2 BS logo é benigno.
38145167	38145178	c.3074_3085delTGGGAAGGGGAGG	deletion	inframe	p.V1025_E1028del	B	BP6- clinvar: benign/likely benign, 2 submissões, última submissão em 2022, ID: 1188640; BS1- frequência alelica alta (>0.1%) em dados populacionais segundo Sherloc criteria (doi:10.1038/gim.2017.37) ; encontrado no artigo PMID: 3586195; e num artigo de doença pulmonar PMID: 31213628 classificada como VUS (rs201134185 GRCh38). PMID: 28358949 "In the proband we found an already known in-frame 12-nt deletion polymorphism in nucleotides 3074_3085 resulting in elimination of four amino acids (rs201134185, c.3074_3085delTGGGAAGGGGAGG, p.Val1025_Glu1028del). The deletion has no clinical significance."; BP3- é uma deleção inframe numa região reopetitiva sendo que ainda nao foi definido a função específica de ORF5; BS2- encontrado em 16 homens saudáveis em hemizigotia numa base de dados de controles ; BP6, BS1, BP3, BS2 ou seja >2 BS logo é benigno.
38145583	38145585	c.2667_2669delGGA	deletion	inframe	p.E890del	B	BP6- clinvar: benign/likely benign, 4 submissões, última submissão em 2021, ID: 257196 "predicted null impact"; frequência alelica elevada (total >5%); classificado como benigno em PMID: 32679846; classificado como um polimorfismo em PMID: 18552978; BA1- benigno.
38145632	38145646	c.2606_2620delAAGAAGGGGAGG AAG	deletion	inframe	p.E869_E873del	PB	BP6- clinvar: benign/likely benign, 4 submissões, última submissão em 2022, ID: 237686; BS1- frequência alelica alta (>0.1%) em dados populacionais segundo Sherloc criteria (doi:10.1038/gim.2017.37) ; BP3- inframe sendo que no rprg na zona orf15, doenças estão associadas a truncating variants; BP6- classificado como benigno em PMID: 27620828; nao foi encontrado em homens saudáveis, apenas em mulheres em heterozigotia; BP6, BS1, BP3, BP6 ou seja BS+BP ou >2 BP logo é classificado como provavelmente benigno.
38145735	38145735	c.2517A>G	snp	synonymous	p.E839=	PB	BP7-SINONIMO sem splice site afetado, BP6- clinvar likely benign, ID:695303; PM2 frequência populacional <0.1% (https://gnomad.broadinstitute.org/variant/X-38286482-T-C?dataset=gnomad_r3) e nao encontrado em individuos saudáveis em grupos controle. BP7, BP6, PM2 ou seja >2BP logo é classificado como provavelmente benigno
38145911	38145911	c.2341G>A	snp	nonsynonymous	p.A781T	B	BP6- clinvar: benign/likely benign, 4 submissões, última submissão em 2022, ID: 257193 "predicted null impact of the variant or pathogenic assertions in the literature or databases" E "it is a conservative change, it occurs at a poorly conserved position in the protein, it is predicted to be benign by multiple in silico algorithms, and/or has population frequency not consistent with disease"; BA1 FREQUENCIA ALELICA ALTA >5%; BP6, BA1 ou seja stand alone logo é benigno.
38146029	38146029	c.2223G>A	snp	synonymous	p.E741=	B	SINONIMO. Clinvar benigno ID:257192; frequência alelica alta >5 BA1 logo benigno.
38146601	38146601	c.1754-103C>T	snp	-	-	B	? situa-se no intrao. Pode afetar o splice site? BP6- clinvar classificado como benigno com uma submissão em 2021 Variation ID:1222758 ; BA1- encontrado em dados populacionais a uma frequência >5%; stand alone Benigno.
Amostra 7 Masculino							
Início	Fim	Variantes	Tipo	Efeito	Proteína	Class	Critérios
38144988	38144988	c.3264G>A	snp	synonymous	p.V1088=	B	sinonimo; clinvar benigno ID: 403389; frequência populacional total >5% e presente em varios homens saudáveis no grupo controle em hemizigotia.
38145033	38145033	c.3219C>T	snp	synonymous	p.G1073=	B	sinonimo; clinvar benigno ID: 403390; frequência populacional total >5% e presente em varios homens saudáveis no grupo controle em hemizigotia.
38145312	38145312	c.2919_2939dupAGGGGAGGAAG GAGAAGGGGA	insertion	inframe	p.G977_E983dup	PB	PM2_sup: absent from controls PMID: 32679846: classificada como VOUS n/a HGMD; BP6-ClinVar Likely benign; BS1: All 1.0322% (557); African 1.7048% (108); Latino 2.0917% (187); Ashkenazi Jewish 0.18939% (3); East Asian 1.1568% (74); South Asian 2.5196% (103); Eur. (Non-Finnish) 0.15876% (35); Eur. (Finnish) 1.2567% (33); Other 0.71942% (14); 557 het, 22 hom, 16 hemi (XLR) PMID: 29555955 - "Two additional patients in our cohort were found to have either an in-frame deletion (c.2203_2226del) or duplication (c.2919_2939dup) in ORF15 of RPGR, which were not interpreted as disease-causing due to the relatively frequent occurrence of such variants in the normal population, although the patient with the duplication revealed a phenotype compatible with RPGR-related retinopathy.";BP3- inframe numa regio repetitiva; BP3- PM2, BS1, BP6- BS+BP logo Provavelmente benigno
38145691	38145711	c.2541_2561delGGAGGGGAAGA GGAGGAAGG	deletion	inframe	p.E850_G856del	B	?Pela bam tem leituras quando deveria estar em homozigotia? Zona repetitiva, alinhamento fica confuso? PM2_sup: absent from controls n/a ClinVar; BP6- PMID: 32679846 - classificado como likely benign VOUS? PMID: 27620828: "In-frame benign variant c.2541_2561del21" e encontrado em 6 casos. BS1- base de dados populacionais frequência >0.1% e BS2-presente em homens saudáveis de grupo controle em hemizigotia;BP3- del inframe numa regio repetitiva; BP3, BP6, BS2, BS1 ou seja >2 BS logo é benigno
38146029	38146029	c.2223G>A	snp	synonymous	p.E741=	B	sinonimo; BP6- clinvar benigno ID: 257192; BA1- frequência populacional total >5% e presente em varios homens saudáveis no grupo controle em hemizigotia. BP4-não afeta o splicing. BA1- benigno
38146601	38146601	c.1754-103C>T	snp	-	-	B	situa-se no intrao. BP4- No alamate não afeta o splice site ; BP6- clinvar classificado como benigno com uma submissão em 2021 Variation ID:1222758 ; BA1- encontrado em dados populacionais a uma frequência >5%; logo Benigno.

Anexo 3- Continuação da Classificação das variantes encontradas segundo os critérios da ACMG. Azul-corresponde as variantes que permaneceram após a aplicação dos filtros referidos na Alissa Interpret. Class- cofresponde á classificação final da variante; B-benigno; PB-provavelmente benigno.